

**Aus der Medizinischen Poliklinik der
Ludwig-Maximilians-Universität München**

Direktor: Prof. Dr. med. Detlef Schlöndorff

**Die Blockade des Chemokinrezeptors CCR1 reduziert bei Mäusen
mit Adriamycin-induzierter Glomerulosklerose die interstitielle
Entzündung und Fibrose**

DISSERTATION

Zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität zu
München

vorgelegt von Elias Berning aus Würzburg

2006

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität, München

Berichterstatter: Prof. Dr. D. Schlöndorff

Mitberichterstatter: Prof. Dr. D. Samtleben
Prof. Dr. J. Diebold

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. V. Vielhauer

Dekan: Prof. Dr. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 09.03.2006

Die Blockade des Chemokinrezeptors CCR1 reduziert bei Mäusen mit Adriamycin-induzierter Glomerulosklerose die interstitielle Entzündung und Fibrose

1.	ZUSAMMENFASSUNG.....	6
2.	EINFÜHRUNG	8
2.2	Pathogenese der progredienten Niereninsuffizienz	9
2.2.1	Physiologische Nierenfunktion	9
2.2.2	Pathogenese entzündlicher Nierenerkrankungen und Bedeutung der Leukozyteninfiltration	10
2.2.3	Progression des renalen Schadens: Bedeutung und Mechanismen der tubulointerstitiellen Entzündung	13
2.3	Bedeutung von Chemokinen und Chemokinrezeptoren im Entzündungsgeschehen ...	17
2.3.1	Chemokine und Chemokinrezeptoren	17
2.3.2	Funktion von Chemokinen und Chemokinrezeptoren.....	21
2.4	Chemokine und Chemokinrezeptoren bei Nierenerkrankungen	22
2.5	Bedeutung der Chemokin- und Chemokinrezeptorantagonisten.....	25
2.5.1	Inhibition der Chemokinaktivität	25
2.5.2	Inhibition von Chemokinrezeptoren.....	26
2.6	Fragestellung der Arbeit	28
3.	METHODEN UND MATERIALIEN	29
3.1	Studienprotokoll	29
3.2	Tierexperimentelle Methodik	31
3.2.1	Tierhaltung	31
3.2.2	Intravenöse Injektion von Adriamycin	32
3.2.3	Injektion von BX471 und Cyclodextrin	32
3.2.4	Urinentnahme	32
3.2.5	Gewinnung von Serum	33
3.2.6	Entnahme und Fixation von Gewebe	33
3.3	Albumin-Bestimmung im Urin	33
3.4	Laborchemische Bestimmungen	34
3.5	Histologische Methoden.....	35

3.5.1	Beschichten der Objektträger	35
3.5.2	Herstellen der Gewebsschnitte	35
3.5.3	Entparaffinieren der Gewebsschnitte	35
3.5.4	Entwässern von Gewebsschnitten	36
3.5.5	PAS-Färbung	36
3.5.6	Silberfärbung	37
3.5.7	Immunhistologie	37
3.5.8	Morphometrische Auswertung der histologischen Präparate	40
3.5.9	Evaluation der Zahl inflammatorischer Zellen	41
3.5.10	Evaluation der Fibroblastenzahl	42
3.6	In-situ-Hybridisierung	42
3.7	Zellkultur und Zellseparation	42
3.8	RNA-Isolation	43
3.9	RNAse Protection Assay (RPA)	44
3.9.1	Synthese der Riboprobe	44
3.9.2	Hybridisierung	46
3.9.3	RNAse-Verdau	46
3.9.4	Proteinase-K-Verdau	46
3.9.5	Extraktion der RNA mit Phenol	47
3.9.6	Fällung der RNA mit Ammoniumazetat	47
3.9.7	Gießen des Sequenziergels	47
3.9.8	Vorbereiten der Gelkammer und Durchführung der Gelelektrophorese	48
3.10	Real-time-PCR	48
3.11	Statistische Auswertung	49
3.12	Lösungen und Reagenzien	50
3.12.1	Chemikalien	50
3.12.2	Lösungen	52
4.	ERGEBNISSE	53
4.1	Charakterisierung des Modells der Adriamycin-induzierten Nephropathie	53
4.1.1	Die Adriamycin-induzierte fokal-segmentale Glomerulosklerose führt zur Albuminurie und zu einer sekundären interstitiellen Fibrose	53
4.1.2	Adriamycin induziert die Expression renaler Chemokine und Chemokinrezeptoren ..	62
4.2	Ergebnisse der Interventionsstudie mit BX471	65

4.2.1	BX471 hat keinen Einfluss auf die Proteinurie, glomeruläre Schädigung und die funktionellen Parameter der Nierenfunktion	65
4.2.1	BX471 reduziert die Akkumulation proinflammatorischer Zellen im Interstitium.....	70
4.2.2	BX471 reduziert die interstitielle Fibrose und die Anzahl interstitieller Fibroblasten	70
5.	DISKUSSION	74
5.1	Chemokine und renale Fibrose	74
5.2	Die Adriamycin-induzierte Nephropathie als Modell der fokal-segmentalen Glomerulosklerose und chronisch-progredienter Nierenerkrankung	74
5.3	Die Administration von Adriamycin induziert eine fokal-segmentale Glomerulosklerose mit interstitieller Chemokinexpression und Leukozyteninfiltration	76
5.4	Die pharmakologische Blockade von CCR1 hat keinen Einfluß auf glomerulären Schaden und Albuminurie	78
5.5	Die pharmakologische Blockade des Chemokinrezeptors CCR1 verringert die interstitielle Akkumulation von Leukozyten	78
5.6	BX471 reduziert die renale Fibrose.....	79
5.7	Die CCR1-vermittelte Reaktion beschränkt sich auf das interstitielle Kompartiment.	81
5.8	Schlussfolgerung der vorliegenden Arbeit	82
6.	ABSTRACT	83
7.	ABKÜRZUNGEN UND BEGRIFFE.....	84
9.	ANHANG.....	95
9.1	Curriculum Vitae	95
9.2	Ehrenwörtliche Erklärung	97
9.3	Danksagung	98

1. Zusammenfassung

Chemokine sind eine Gruppe chemisch verwandter chemotaktischer Zytokine. Durch die Interaktion mit membranständigen G-Protein-gekoppelten Chemokinrezeptoren vermitteln sie die Migration von Leukozyten in entzündetes Gewebe. Infiltrierende Leukozyten unterhalten die Entzündung und führen im weiteren Verlauf der Erkrankung zu parenchymatöser Zellschädigung und Fibrosierung. Am Modell der unilateralen Ureterligatur (Anders 2001) wurde gezeigt, dass die Blockade des Chemokinrezeptors CCR1 die Akkumulation proinflammatorischer Zellen im Interstitium der Niere inhibiert und damit das Ausmaß der Fibrose reduzieren kann. Bisher nicht bekannt ist der Effekt der pharmakologischen Blockade von CCR1 bei Modellen von Nierenerkrankungen mit primär glomerulärem Schaden und sekundären interstitiellen Läsionen. Um dieser Frage nachzugehen wurde in der vorliegenden Arbeit ein murines Modell einer fokalsegmentalen Glomerulosklerose durch Injektion von Adriamycin (ADR) charakterisiert und die Auswirkungen der Behandlung mit dem CCR1-Antagonisten BX471 untersucht. Nach Studien zur Dosisfindung wurden für das Experiment sechs Untergruppen gebildet:

- A1: ADR
- A2: NaCl 0,9 %
- B1: ADR + Cyclodextrin
- B2: ADR + BX471, gelöst in Cyclodextrin
- B3: NaCl 0,9 % + Cyclodextrin
- B4: NaCl 0,9 % + BX471

Die Behandlung mit ADR bestand in der intravenösen Injektion von 13 mg/kg der Substanz an den Tagen 0 und 14 des Experimentes. BX471 bzw. Cyclodextrin wurden ab dem 14. Tag dreimal täglich subkutan appliziert. Die Gesamtdauer des Experiments betrug sechs Wochen. Bei allen mit ADR behandelten Tieren ergab sich in der histologischen Auswertung eine fokalsegmentale Glomerulosklerose, assoziiert mit tubulointerstitiellem Schaden, bestehend aus tubulärer Erweiterung und Atrophie, interstitieller Akkumulation von inflammatorischen Zellen und Fibrose. Im Vergleich mit Kontrolltieren der Gruppe A2 kam es zu einer verstärkten renalen mRNA-Expression des Chemokinrezeptors CCR1 sowie seiner Liganden MIP-1 α und RANTES.

Die Behandlung mit dem CCR1-Antagonisten BX471 resultierte in einer Reduktion der Akkumulation von Makrophagen (52 %) und Lymphozyten (24 %) im Interstitium der ADR-

behandelten Tiere im Vergleich zur Vehikel-behandelten Kontrollgruppe B1. Des Weiteren konnte eine signifikante Verminderung von Parametern der interstitiellen Fibrose wie interstitielles Volumen (23 %) und der Akkumulation von Fibroblasten (49 %) ermittelt werden.

Im Gegensatz dazu nahm die Behandlung mit BX471 keinen Einfluss auf die glomeruläre Pathologie. Die Albuminurie und das Ausmaß der glomerulären Sklerose wiesen keine signifikanten Unterschiede zwischen BX471- und Vehikel-behandelter Gruppe auf.

In den nicht ADR-behandelten Kontrollgruppen B3 und B4 wurde nach Injektion der Vehikelsubstanz bzw. BX471 keine renale Schädigung beobachtet.

Nach den Ergebnissen der durchgeführten Experimente reduziert die Blockade von CCR1 bei der ADR-induzierten fokal-segmentalen Glomerulosklerose die Akkumulation inflammatorischer Zellen im Interstitium und die nachfolgende interstitielle Fibrose. Glomerulärer Schaden und Proteinurie bleiben davon unberührt.

Diese Ergebnisse sind insofern von großer Bedeutung, als dieses Modell fokal-segmentaler Glomerulosklerose mit primärer glomerulärer Schädigung der Pathophysiologie vieler menschlicher Nierenerkrankungen ähnelt. Es ist also denkbar, dass sich durch die Blockade von CCR1 auch beim Menschen die Entwicklung interstitieller Entzündung und Fibrose verringert und somit die Progression zur terminalen Niereninsuffizienz bei chronisch-proteinurischen Nephropathien verlangsamt werden könnte.

2. Einführung

2.1 Medizinische und gesellschaftliche Bedeutung der Niereninsuffizienz

Die chronisch progrediente Niereninsuffizienz ist immer noch ein schwer zu therapierendes Krankheitsbild. Bei eingeschränkter Nierenfunktion kommt es durch verminderte Exkretion von Stoffwechselabbauprodukten, einem gestörten Elektrolyt- und Wasserhaushalt sowie der Beeinträchtigung endokriner Funktionen zu einer Vielzahl von potentiell lebensbedrohlichen Symptomen und damit zu einer beträchtlichen Einschränkung der Lebensqualität (Abb. 1).

Serum-Kreatinin-Spiegel	Symptomatik
1–2	abnormes Urinsediment
2–6	Anämie, Hypertonie, verminderte Phosphatexkretion → Abnahme des ionisierten Ca^{++} → Entwicklung eines sekundären Hyperparathyreoidismus
6–12	Na^+ - und H_2O -Retention → Ödeme, fluid lung, Herzinsuffizienz, Hypertonie Gastrointestinale Symptome, Pruritus, Hyperphosphatämie, Hypokalzämie, renale Osteopathie, urämische Neuropathie, gestörte Gonadenfunktion, Impotenz
>12	Wie oben + Motorische Neuropathie, Enzephalopathie, Perikarditis, Pleuritis, Lungenödem, Blutungsneigung, Koma, Tod
Zeit----->	

Abbildung 1: Die Symptomatik der progredienten Niereninsuffizienz und ihre Beziehung zum Serum-Kreatinin-Spiegel

Anhand epidemiologischer Zahlen wird deutlich, dass die Niereninsuffizienz nicht nur eine Belastung für das Leben der Betroffenen darstellt, sondern auch ein enormer Kostenfaktor im Gesundheitswesen ist. Zum Jahreswechsel 2001/2002 waren in Deutschland 57.118 Menschen dialysepflichtig, in Nachbetreuung nach Transplantation befanden sich 18.000 Men-

schen (Frei 2002). Bei jährlichen Dialysekosten zwischen 30.000 und 55.000 Euro je Patient werden die Krankenkassen in Deutschland jährlich mit 2,9 Milliarden Euro belastet. Dies bedeutet, dass 0,08 % der Bevölkerung mehr als 2 % des Budgets der gesetzlichen Krankenkassen in Anspruch nehmen (Nebel 2002).

Mit Kosten von 17.000 Euro/Jahr ist die Nierentransplantation nicht nur die bestmögliche, sondern auch eine wirtschaftliche Behandlungsform der terminalen Niereninsuffizienz. Der Bedarf zur Transplantation verfügbarer Nieren übersteigt jedoch das Angebot. In den nächsten Jahren werden vor allem die absehbare strukturelle Veränderung des Altersaufbaus der Bevölkerung und damit auch ein Zunehmen von sog. Zivilisationserkrankungen zu einer weiteren Verschärfung dieser Situation führen. Gerade Erkrankungen wie Diabetes mellitus, bei denen es im Rahmen einer proteinurischen Erkrankung zu einer progredienten Einschränkung der Nierenfunktion kommt, benötigen daher dringend neue Therapieoptionen, die die Progredienz zur terminalen Niereninsuffizienz hinauszögern können.

2.2 Pathogenese der progredienten Niereninsuffizienz

2.2.1 Physiologische Nierenfunktion

Die Niere erfüllt zahlreiche Funktionen, die für das Gleichgewicht von Körperflüssigkeiten und Elektrolyten von Bedeutung sind. Im Glomerulus werden beständig größere Mengen eines Ultrafiltrates des Blutplasmas erzeugt, das beim Durchfluss durch das tubuläre System zum endgültigen Harn konzentriert wird. Die hierzu notwendigen spezifischen Vorgänge finden entlang der Epithelien der Nephrone und Sammelrohre statt. Außerdem ist die Niere Produktionsort wichtiger Hormone. Die meisten Aufgaben der Nieren lassen sich an den Folgen einer Niereninsuffizienz ablesen (Tab. 1).

Tabelle 1: Die physiologischen Funktionen der Niere und ihre Veränderung als Folge der progredienten Niereninsuffizienz

Funktion	Folge der Niereninsuffizienz	Therapie
Entgiftung	Urämie	Dialyse
Bilanzierung des Säure-Basen-Haushaltes	Azidose	Alkalisierende Therapie, Dialyse
Ausscheidung von Kalium und Phosphat	Hyperkaliämie, Hyperphosphatämie → Hyperparathyreoidismus	Diuretika, Dialyse, Phosphatbinder
Regulation des Wasserhaushaltes	Ödeme, Hypertonie	Diuretika, antihypertensive Therapie, Dialyse
Produktion von Erythropoietin	Renale Anämie	Applikation rekombinanten Erythropoietins
Hydroxilierung von Calcidiol	Vitamin-D-Mangel, sekundärer Hyperparathyreoidismus	Applikation von Calcitriol
Produktion von Renin	Hypertonie	Antihypertensive Therapie

2.2.2 Pathogenese entzündlicher Nierenerkrankungen und Bedeutung der Leukozyteninfiltration

Zahlreiche erworbene und angeborene Nierenerkrankungen münden in die chronische Niereninsuffizienz ein (Kuhlmann 1994):

- primäre und sekundäre Glomerulopathien (vor allem die diabetische Nephropathie)
- primäre oder sekundäre tubulointerstitielle Nephritiden
- vaskuläre Nephrosklerose (bei Hypertonie)
- kongenitale Zystennieren

Die prozentuale Verteilung einzelner Diagnosen erfasster lebender dialysepflichtiger Patienten in Deutschland (Stand: 2001) ist in Abb. 2 dargestellt.

Allgemein münden verschiedene pathologische Faktoren in die gemeinsame Endstrecke des tubulointerstitiellen Schadens. Im Rahmen von Glomerulopathien kommt es zur Schädigung der Glomeruli durch immunologische oder nicht immunologische Mechanismen. Nicht immunologische Mechanismen finden sich beispielsweise im Rahmen des Diabetes mellitus und des hämolytisch-urämischen Syndroms. Mechanismen glomerulärer Schädigung durch immunologische Vorgänge sind

- Ablagerung zirkulierender Immunkomplexe
- Bindung zirkulierender Antikörper an glomeruläre Antigene
- zelluläre Immunreaktionen im Rahmen der minimal-change-Nephritis (Kuhlmann 1994)

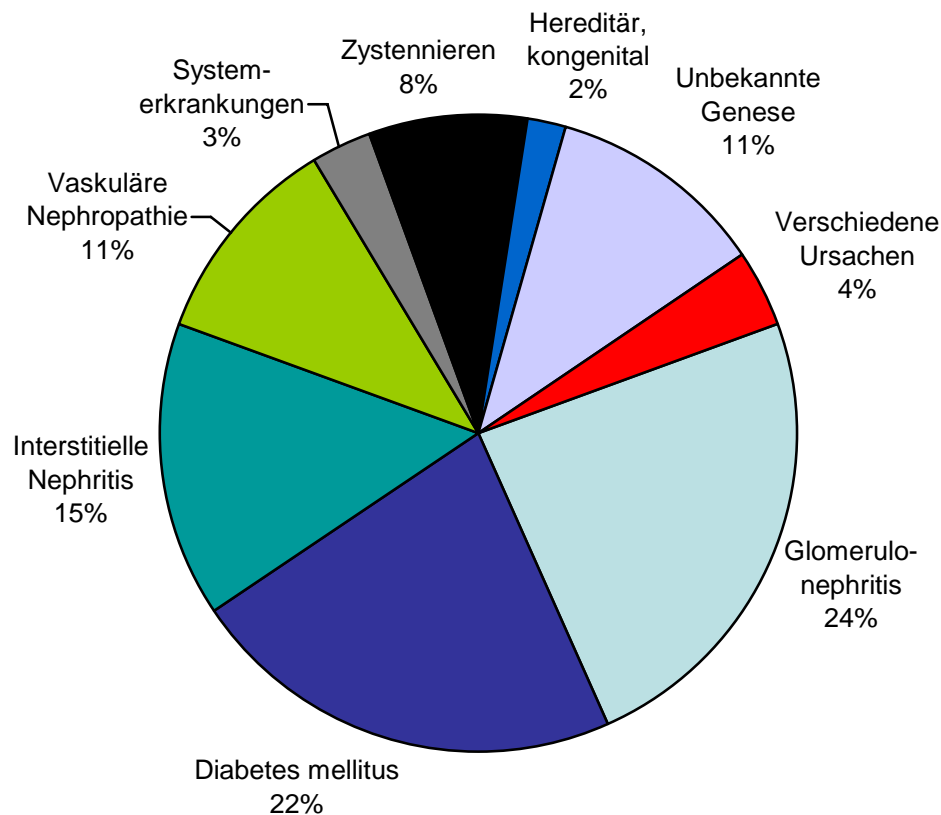


Abbildung 2: Diagnoseverteilung erfasster lebender dialysepflichtiger Patienten in Deutschland, 2001 (Frei 2002)

Viele Nephropathien schreiten langsam zum terminalen Nierenversagen fort und nur wenige haben die Tendenz auszuheilen. Diese Progression ist durch eine zunehmende Schädigung des Glomerulus und sekundär des Tubulointerstitiums gekennzeichnet und lässt sich in vier Phasen einteilen: die Initiationsphase, die Amplifikationsphase, die Progressionsphase und die Terminalphase.

2.2.2.1 Initiationsphase

Es gibt verschiedene Mechanismen, die als Ausgangspunkte des Entzündungsgeschehens eine Rolle spielen. Beispiele für eine initiale Schädigung sind immunologische Mechanismen wie die Ablagerung von Immunkomplexen mit Aktivierung der Komplementkaskade, Toxine oder auch Hypoxie. Die Schädigung renaler Parenchymzellen führt zur Sekretion inflammatorischer Mediatoren, die die Infiltration und Aktivierung von Leukozyten zur Folge haben. Diese

Infiltration durch Leukozyten ist ein entscheidender Schritt, der über Progression oder Resolution der renalen Schädigung entscheidet. In Verbindung mit Selektinen und Integrinen vermitteln lokal exprimierte Chemokine und Zytokine in einem komplizierten Netzwerk diese lokale Immunantwort. Dabei ist sie je nach initialer Schädigung zunächst auf das betroffene Kompartiment, Glomerulus oder Tubulointerstitium beschränkt (Vielhauer 2004).

2.2.2.2 Amplifikationsphase

Die Infiltration von Leukozyten aus Blutgefäßen in das betroffene Gewebe sowie die Proliferation residenter Leukozyten führen nach ihrer Aktivierung zu einer verstärkten Synthese und Ausschüttung von Zytokinen und anderer inflammatorischer Mediatoren. Das führt nach einiger Zeit dazu, dass nicht mehr primär ortsständige Zellen, sondern infiltrierte Leukozyten die Hauptquelle von proinflammatorischen Substanzen sind. Makrophagen sind für die Ausschüttung von Wachstumsfaktoren wie FGF, TGF- β , TNF- α , EGF und PDGF, von Sauerstoffradikalen, Arachidonsäurederivaten und anderen zelltoxischen Stoffen verantwortlich (Eddy 1989). Dadurch wiederum kommt es zur Schädigung der glomerulären Filtrationsbarriere und damit zur Proteinurie.

Bei primären Glomerulopathien mit progressivem Verlauf kommt es mit hoher Inzidenz zu einer interstitiellen Entzündung und zur renalen Fibrose. Hierfür kommen mehrere Mechanismen in Frage, bei denen dem tubulären Epithel eine vermittelnde Rolle zwischen dem glomerulären und dem interstitiellen Kompartiment zukommt. Proinflammatorische Mediatoren und Wachstumsfaktoren werden mit dem Primärfiltrat in die Tubuli des Nephrons gespült und stimulieren dort tubuläre Epithelzellen, die durch die Ausschüttung proinflammatorischer, profibrotischer und chemotaktischer Zytokine durch parakrine Stimulation auf ihre Umgebung wirken. Aber auch die versorgenden Blutgefäße bringen Entzündungsmediatoren in das tubuläre Kompartiment und aktivieren dadurch peritubuläres Endothel und Tubuluszellen (Abbate 1998). Durch Schädigung der Bowmann'schen Kapsel fehlgeleitetes Ultrafiltrat, das ins Interstitium gelangt ist, kann dort ebenfalls entzündliche Prozesse auslösen (Kriz 1996). Die Sekretion proinflammatorischer Mediatoren durch aktivierte Tubulusepithelzellen unterhält und verstärkt die Rekrutierung von Leukozyten ins Interstitium und ist damit für das Fortschreiten der Entzündung verantwortlich. Die Ausschüttung profibrotischer Substanzen und die Proliferation interstitieller Fibroblasten führt zur Ablagerung extrazellulärer Matrix, der Expansion des interstitiellen Volumens und somit zur renalen Fibrose.

2.2.2.3 Progressionsphase

Die fortwährende Stimulation renaler Parenchymzellen durch Leukozyten, sezernierte Zytokine und Proteinurie mündet in die ständige Synthese von Komponenten der extrazellulären Matrix und schließlich in die irreversible Schädigung der anatomischen Struktur. Sie führt dadurch zum Verlust der physiologischen Funktion. Glomeruläre Mesangialzellen sezernieren nach Stimulation durch Makrophagen Kollagen, Laminin und Fibronectin und sind damit entscheidende Faktoren bei der Entstehung der Glomerulosklerose (Pawluczyk 1997). Die glomeruläre Expansion führt zur Obliteration bei einem Teil der glomerulären Kapillaren, bei einem anderen Teil dagegen zur Dilatation. Die Folgen sind nicht nur die lokale Destruktion im Glomerulus, sondern auch sekundär eine Schädigung des gesamten Nephrons inklusive tubulärer und peritubulärer Anteile (Kriz 1996). Die Migration leukozytärer Effektorzellen ins Interstitium führt neben der ständigen Produktion und Ausschüttung von Zytokinen und Komponenten der extrazellulären Matrix auch zu einer vergrößerten Distanz zwischen Kapillaren und der über sie versorgten Gewebeanteile (Ljungquist 1963). Die dadurch induzierte Ischämie trägt zur Schädigung der Tubuluszellen bei, die durch apoptotische und nekrotische Veränderungen und schließlich Atrophie der Tubuli charakterisiert ist (Kang 2002).

2.2.2.4 Terminalphase

Die fortschreitende Vernarbung des Gewebes und das Zugrundegehen der Blutgefäße führen zur kompletten tubulären Atrophie und Glomerulosklerose. Der Verlust großer Teile des renalen Parenchyms, der normalen anatomischen Strukturen und deren Funktion mündet schließlich in die terminale Niereninsuffizienz mit allen klinischen Zeichen und Symptomen der Urämie. Während sich das leukozytäre Infiltrat zurückbildet, sorgen die bestehende Hypoxämie und die autokrine Stimulation für eine Aufrechterhaltung von Synthese und Ausschüttung extrazellulärer Matrixkomponenten durch renale Fibroblasten (Norman 1999). Myofibroblasten führen schließlich über Kontraktion des fibrotischen Gewebes zum makroskopischen Korrelat, der Schrumpfniere.

2.2.3 Progression des renalen Schadens: Bedeutung und Mechanismen der tubulointerstitiellen Entzündung

Besondere Relevanz für die Progression chronischer Nierenerkrankungen kommt den interstitiellen Nierenveränderungen zu, die als gemeinsame Endstrecke unabhängig von der primären

glomerulären Schädigung auftreten. Die als Folgeerscheinung des Glomerulusschadens auftretende interstitielle Nephritis korreliert hierbei in ihrem Ausmaß eng mit der Progression zur dialysepflichtigen Niereninsuffizienz. Die Untersuchung von menschlichem Biopsiematerial zeigte, dass tubulointerstitieller Schaden und das Ausmaß interstitieller Leukozyteninfiltration Parameter sind, die unabhängig von der primären Läsion mit dem Verlust der Nierenfunktion und der Progression zur terminalen Niereninsuffizienz korrelieren (Bohle 1996, Risdon 1968).

2.2.3.1 Tubuluszellen als Mediatoren der interstitiellen Entzündung

Den Tubuluszellen kommt eine wichtige Rolle in der Pathogenese der interstitiellen Entzündung zu. Neben der direkten Aktivierung durch proinflammatorische Mediatoren im Ultrafiltrat und in den postglomerulären Kapillaren stellt vor allem die Proteinurie einen Stimulus für Proliferation und Sekretion proinflammatorischer Substanzen dar. Die gestörte Schrankenfunktion der glomerulären Barriere führt zur vermehrten Filtration großmolekularer Bestandteile. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass die Proteinurie einen Risikofaktor für die Verschlechterung der Nierenfunktion darstellt (Wehrmann 1990). In vitro stimulierte die Zugabe von Albumin zu kultivierten Tubulusepithelzellen die Sekretion von Endothelin-1 (Zoja 1995) sowie der Chemokine CCL2/MCP-1 (Wang 1997) und CCL5/RANTES (Zoja 1998). In einer polarisierten Tubulusepithelschicht – also kultivierten Tubuluszellen, deren Ausrichtung der physiologischen Organisation und Kompartimentierung entspricht – werden Endothelin, CCL2/MCP-1 und CCL5/RANTES in das basolaterale Kompartiment sezerniert (Wang 1997, Zoja 1995, Zoja 1998). Wenn dieses Sekretionsverhalten auch in vivo aufträte, könnte die Sekretion der genannten Mediatoren eine Migration von Leukozyten in das Interstitium stimulieren und die Proliferation von Fibroblasten sowie eine gesteigerte Synthese extrazellulärer Matrix bewirken. In vivo beschreibt Eddy das Modell der "Protein-overload-Proteinurie" durch die Behandlung von Ratten mit bovinem Serumalbumin (Eddy 1989). Nach täglicher Injektion von BSA kam es bei den Tieren zur Proteinurie, zu einem signifikanten Anstieg der interstitiellen Leukozytenzahl und zur ausgeprägten interstitiellen Fibrose. Anhand von Nierenbiopsien von Ratten mit Doxorubicin-induzierter Proteinurie konnte die Ablagerung filtrierter Proteine im Cytoplasma proximaler Tubuluszellen gezeigt werden, die Brüche in der Basalmembran und damit die Extravasation von Zellinhalt ins Interstitium verursachten. Infolge dieser Zellschädigung wurden eine entzündliche Reaktion sowie tubulointerstitieller und glomerulärer Schaden beschrieben (Remuzzi 1990).

Bei Nephropathien menschlicher Patienten wurde in Langzeitstudien beobachtet, dass eine ausgeprägte Proteinurie mit einer schnelleren Progression zur terminalen Niereninsuffizienz korreliert (Mallick 1987). So kommt es bei Patienten mit therapieresistenter Minimal-Change-Nephritis und chronischer Proteinurie zum unausweichlichen Verlust der Nierenfunktion und somit zur Dialysepflichtigkeit (Cameron 1988). Bei Patienten mit IgA-Nephritis, membranöser, membranoproliferativer sowie fokaler Glomerulosklerose und diabetischer Nephropathie konnte gezeigt werden, dass Proteinurie mit tubulointerstitieller Infiltration durch Monozyten und T-Lymphozyten assoziiert ist und einen Indikator für eine Verschlechterung der Nierenfunktion darstellt (D'Amico 1992).

2.2.3.2 Bedeutung des interstitiellen Leukozyteninfiltrates

Alle progressiven Nierenerkrankungen sind letztendlich die Folge eines destruktiven fibrotischen Prozesses. In der Pathogenese der Fibrose kommt ortständigen und immigrierten Leukozyten eine besondere Rolle zu. Im Erkrankungsverlauf stellen Leukozyten die Hauptquelle entzündungsfördernder Mediatoren dar, darunter Chemokine, Cytokine, NO und Wachstumsfaktoren (Zeisberg 2000). Durch die Sekretion dieser Faktoren kommt es zur Imbalance in der Homöostase der Bindegewebsproduktion: Wachstumsfaktoren wie TGF- β (transforming growth factor β) und PDGF stimulieren in vitro die Produktion von Komponenten extrazellulärer Matrix wie Kollagen I, III, und Proteoglykanen (Chen 1987, Roberts 1986, Savage 1989), während die proteolytische Degradation der neu produzierten Matrix durch Metalloproteinasen verhindert wird. Verantwortlich für diesen verminderten Abbau sind Gewebsinhibitoren von Metalloproteinasen, die sog. TIMP (Tissue Inhibitors of Metalloproteinases), deren Sekretion durch TGF- β induziert wird. Gleichzeitig inhibiert TGF- β die Transskription von anderen proteolytischen Faktoren wie Stromelysin und Collagenase (Edwards 1987).

In vivo konnte durch die Intervention mit neutralisierenden Antikörpern gegen TGF- β und PDGF die Akkumulation interstitieller Matrix bei mesangioproliferativer Glomerulonephritis vermindert werden (Border 1991, Johnson 1992).

In einem weiteren experimentellen Modell, bei dem eine fokale glomeruläre Sklerose durch die Verabreichung von Puromycin-Aminonukleosid und Protaminsulfat induziert wurde, konnte gezeigt werden, dass die Einschränkung der Nierenfunktion mit dem Ausmaß der Leukozyteninfiltration korreliert. Ausserdem verbesserte sich die Nierenfunktion auch noch nach Initiation des glomerulären Schadens durch die Intervention mit Prednisolon und stand

in eindeutigem Zusammenhang mit der Reduktion der Leukozyteninfiltration (Saito 1990). Der glomeruläre Schaden blieb durch die Steroidbehandlung unbeeinflusst.

Die interstitielle Akkumulation von Leukozyten ist ein wichtiger Promotor der progressiven Niereninsuffizienz, nicht nur Konsequenz des tubulären Schadens. Sie tritt bereits vor dem Sichtbarwerden histologischer Schädigung auf und zeigt eine signifikante Korrelation mit interstitieller Fibrose und dem klinischen Erscheinungsbild der Erkrankung. Eine Reduktion des leukozytären Infiltrates führt zur Verlangsamung der Progression zur terminalen Niereninsuffizienz und damit zur Verbesserung der Prognose der Krankheit.

2.2.3.3 Interaktion von Tubuluszellen und Fibroblasten

Tubuluszellen sind in der Lage, unabhängig von der Leukozytenimmigration Fibroblasten zu stimulieren. Die Tubuluszellen sind Produktionsstätte für eine Vielzahl von Molekülen, darunter Zytokine wie $\text{TNF-}\alpha$ (Wuthrich 1990), Komplementfaktoren (Broolmans 1991), Wachstumsfaktoren (Segal 1989) und vasoaktive Peptide (Navar 1992). Obwohl die genauere Bedeutung dieser Botenstoffe für die Niere noch nicht vollständig bekannt ist, ist anzunehmen, dass eine Schädigung von Tubuluszellen ein Ungleichgewicht von Synthese und Sekretion dieser Faktoren hervorrufen kann. Durch die parakrine Stimulation von Fibroblasten und inflammatorischen Zellen wird das Entzündungsgeschehen unterhalten.

2.3 Bedeutung von Chemokinen und Chemokinrezeptoren im Entzündungsgeschehen

Der Rekrutierung immunkompetenter Zellen kommt in jedem entzündlichen Prozess eine wichtige Rolle zu. In Verbindung mit Selektinen und Integrinen (Springer 1994) vermitteln Chemokine in einem komplizierten Netzwerk die Immunantwort des Organismus.

2.3.1 Chemokine und Chemokinrezeptoren

Chemokine stellen eine große Familie strukturell verwandter *chemotaktischer Zytokine* dar. Beinahe alle Zelltypen, nicht nur inflammatorische Zellen, haben die Fähigkeit zur Produktion dieser Proteine, deren Molekülgröße im Bereich zwischen 8 und 10 kDa liegt. Die charakteristische Tertiärstruktur der Moleküle wird von Disulfidbrücken bestimmt, die sich zwischen konservierten Cysteinresten ausbilden. Mittlerweile sind über 40 verschiedene Chemokine bekannt. Die zur Zeit gängige Einteilung gruppiert die Chemokine nach der Position der ersten beiden Cysteinreste im Molekül. Die beiden wichtigsten Untergruppen sind die CC- und die CXC-Familie. Bei der Familie der CC-Chemokine befinden sich die Cysteinreste (C) in unmittelbarer Nachbarschaft, während sich bei den Chemokinen der CXC-Familie eine beliebige Aminosäure (X) zwischen den Cysteinresten befindet. Die beiden weiteren Untergruppen enthalten zurzeit nur wenige Vertreter: Lymphotactin ist einziger Repräsentant der Gruppe der C-Chemokine. Den C-Chemokinen fehlt ein N-terminales Cystein, die Ähnlichkeit des Carboxylendes kennzeichnet sie jedoch eindeutig als Chemokine. Fractalkine ist ein Vertreter der CX₃C-Subfamilie. Zwischen den Cysteinresten befinden sich hier drei Aminosäuren. Es ist gleichzeitig das einzige bisher bekannte membranständige Chemokin. Mit der Klassifikation der Chemokine einigte man sich auch auf eine Nomenklatur, die sich aus ihrer Gruppenzugehörigkeit, gefolgt von L für Ligand, und einer fortlaufenden Nummer zusammensetzt (Tab. 2).

Neben der Klassifikation nach strukturellen Merkmalen lassen sich die Chemokine nach funktionellen Gesichtspunkten in homeostatische und inflammatorische Chemokine unterteilen. Inflammatorische Chemokine sind beteiligt an akuten und chronischen Entzündungsprozessen, während homeostatische Chemokine eine sog. „housekeeping“-Funktion besitzen. Beispielsweise werden in Thymus und Lymphknoten CCL17/TARC, CCL19/MIP-3 β und CCL21/6CKine beständig in hohen Konzentrationen exprimiert und sind für die physiologi-

sche Migration von T- und B-Lymphozyten in diese lymphatischen Organe verantwortlich (Yoshie 1997).

Tabelle 2: bekannte CXC-, C-, CX3C- und CC-Chemokine bei Mensch und Maus

CXC-Unterfamilie				
Bezeichnung	Chromosom	Ligand Mensch	Ligand Maus	Rezeptor
CXCL1	4q12-q13	GRO α / MGSA- α	GRO / MIP-2 / KC	CXCR2>CXCR1
CXCL2	4q12-q13	GRO β / MGSA- β	GRO / KC	CXCR2
CXCL3	4q12-q13	GRO χ / MGSA- χ	GRO / KC	CXCR2
CXCL4	4q12-q13	PF4	PF4	Unbekannt
CXCL5	4q12-q13	ENA-78	LIX	CXCR2
CXCL6	4q12-q13	GCP-2	CK α -3	CXCR1, CXCR2
CXCL7	4q12-q13	NAP-2	Unbekannt	CXCR2
CXCL8	4q12-q13	IL-8	Unbekannt	CXCR1, CXCR2
CXCL9	4q21.21	Mig	Mig	CXCR3
CXCL10	4q21.21	IP-10	IP-10	CXCR3
CXCL11	4q21.21	I-TAC	Unbekannt	CXCR3
CXCL12	10q11.1	SDF-1 α/β	SDF-1	CXCR4
CXCL13	4q21	BLC / BSA-1	BLC / BCA-1	CXCR5
CXCL14	Unbekannt	BRAK / bolekin	BRAK	Unbekannt
CXCL15	Unbekannt	Unbekannt	Lungkin	Unbekannt
C-Unterfamilie				
Bezeichnung	Chromosom	Ligand Mensch	Ligand Maus	Rezeptor
XCL1	1q23	Lymphotactin / SCM-1 α / ATAC	Lymphotactin	XCR1
XCL2	1q23	SCM-1 β	Unbekannt	XCR1
CX3C-Unterfamilie				
Bezeichnung	Chromosom	Ligand Mensch	Ligand Maus	Rezeptor
CX3CL1	16q13	Fractalkin	Neurotactin	CX3CR1

CC-Unterfamilie				
Bezeichnung	Chromosom	Ligand Mensch	Ligand Maus	Rezeptor
CCL1	17q11.2	I-309	TCA-3, P500	CCR8
CCL2	17q11.2	MCP-1 / MCAF	JE	CCR2
CCL3	17q11.2	MIP-1 α / LD76 α	MIP-1 α	CCR1, CCR5
CCL4	17q11.2	MIP-1 β	MIP-1 β	CCR5
CCL5	17q11.2	RANTES	RANTES	CCR1, CCR3, CCR5
CCL6	17q11.2	Unbekannt	C10, MRP-1	Unbekannt
CCL7	17q11.2	MCP-3	MARC	CCR1, CCR2, CCR3
CCL8	17q11.2	MCP-2	MCP-2	CCR3
CCL9/10	17q11.2	Unbekannt	MRP-2, CCF 18, MIP-1 χ	Unbekannt
CCL11	17q11.2	Eotaxin	Eotaxin	CCR3
CCL12	17q11.2	Unbekannt	MCP-5	CCR2
CCL13	17q11.2	MCP-4	Unbekannt	CCR2, CCR3
CCL14	17q11.2	HCC-1	Unbekannt	CCR1
CCL15	17q11.2	HCC-2 / Lkn-1 / MIP-1 δ	Unbekannt	CCR1, CCR3
CCL16	17q11.2	HCC-4 / LEC	LCC-1	CCR1
CCL17	16q13	TARC	TARC	CCR4
CCL18	17q11.2	DC-CK1 / PARC AMAC-1	Unbekannt	Unbekannt
CCL19	9p13	MIP-3 β / ELC / exodus-3	MIP-3 β / ELC / exodus-3	CCR7
CCL20	2q33-q37	MIP-3 α / LARC / exodus-1	MIP-3 α / LARC / exodus-1	CCR6
CCL21	9p13	6Ckine / SLC / exodus-2	6Ckine / SLC / exodus-2	CCR7
CCL22	16q13	MDC / STCP-1	ABCD-1	CCR4
CCL23	17q11.2	MPIF-1	Unbekannt	CCR1
CCL24	7q11.23	MPIF-2 / Eotaxin-2	Unbekannt	CCR3
CCL25	19p13.2	TECK	Teck	CCR9
CCL26	7q11.23	Eotaxin-3	Unbekannt	CCR3
CCL27	9p13	CTACK / ILC	ALP / CTACK / ILC / ESKine	CCR10

Tabelle 3: Bekannte Chemokinrezeptoren und ihre Liganden auf verschiedenen Zellpopulationen

Rezeptor	Ligand	Zelltypen
CXCR1	IL-8	Neutrophile
CXCR2	IL-8, NAP-2, Gro α , ENA-78	Neutrophile
CXCR3	IP-10, MIG, ITAC	aktivierte T-Zellen
CXCR4	SDF-1	Naive T-Zellen, B-Zellen
CXCR5	BCA-1	B-Zellen
CCR1	MCP-3, RANTES, MIP-1 α	aktivierte T-Zellen, Monozyten, Eosinophile, dendritische Zellen
CCR2	MCP-1,-2,-3,-4,-5	Monozyten, Makrophagen, aktivierte T-Zellen
CCR3	Eotaxin, MCP-3,-4, RANTES	Eosinophile, Basophile, aktivierte T-Zellen
CCR4	TARC, MIP-1 α , RANTES, MDC	aktivierte T-Zellen, Basophile, Thrombozyten
CCR5	MIP-1 β , RANTES, MIP-1 α	aktivierte T-Zellen, Monozyten, Makrophagen, dendritische Zellen
CCR6	MIP-3 α	Dendritische Zellen, T-Zellen
CCR7	MIP-3 β	B-Zellen, T-Zellen, dendritische Zellen
CCR8	I-309	Monozyten, Makrophagen
CCR9	CC-Chemokine	nicht-hämatopoietische Zellen
Duffy antigen receptor	IL-8, Gro α , RANTES, MCP-1	Erythrozyten
CX ₃ CR1	Fractalkine (Neurotactin)	Natürliche Killerzellen, CD8-positive T-Zellen

Chemokine interagieren mit speziellen Rezeptoren. Es handelt sich hierbei um membranständige G-Protein-gekoppelte Moleküle mit sieben transmembranen Domänen (Murphy 1994, Premack 1997). Wie bei jeder G-Protein-vermittelten Aktivierungskaskade führt die Bindung eines Liganden an den passenden Rezeptor zum Austausch von GDP gegen GTP an der α -Untereinheit des G-Proteins. Das G-Protein dissoziiert vom Rezeptor und beeinflusst verschiedene weitere Effektormoleküle. Dadurch kommt es zur Aktivierung einer Signalkaskade im cytoplasmatischen Kompartiment der Effektorzelle. Tab. 3 führt wichtige Chemokinrezeptoren und ihre Liganden auf.

2.3.2 Funktion von Chemokinen und Chemokinrezeptoren

Chemokine spielen eine wichtige Rolle bei der Rekrutierung und Aktivierung von Leukozyten. Freigesetzt am Ort einer Schädigung, diffundieren sie in das umgebende Gewebe. Als basische Proteine gehen sie Bindungen mit Glykosaminoglykanen und Proteoglykanen ein, sowohl im interstitiellen Gewebe als auch auf Kapillarendothelien. Hier wirken sie als "Wegweiser" für intravasale Leukozyten. Die Migration von Leukozyten aus dem intravasalen Raum in ein bestimmtes interstitielles Gebiet erfordert komplexe Interaktionen zwischen Molekülen auf den Leukozyten, der endothelialen Oberfläche und in der extrazellulären Matrix. Chemokine sind wichtige Mediatoren dieser Leukozyten-Endothel-Interaktion. Im Wesentlichen läuft dieser Prozess in drei Stufen ab (Springer 1994):

In einem ersten Schritt "rollt" der Leukozyt über das Kapillarendothel. Dieser transiente Prozess wird durch epithelial und leukozytär exprimierte Selektine und ihre Kohlenhydratligenanden vermittelt (Springer 1995). Im Bereich der Entzündung werden von aktivierten Thrombozyten und Endothelzellen Chemokine ausgeschüttet, die – von Endothelzellen präsentiert – ein Signal für diese *rolling leukocytes* darstellen (Springer 1995). Die Bindung von Chemokinen an leukozytenständige Chemokinrezeptoren führt innerhalb von Millisekunden zur Aktivierung von Integrinen auf der Oberfläche des rollenden Leukozyten. Dadurch wird die Intergrinbindung an endotheliale Liganden und damit die feste Adhäsion des Leukozyten an das Endothel ermöglicht. Unter anderem ist bekannt, dass die Bindung von spezifischen Liganden an den Chemokinrezeptor CCR1 zur Aktivierung von β -Integrinen führt, die zur Adhäsion der Leukozyten am aktivierten Endothel führen (Liang 2000). Dieser irreversible Arrest ist die Voraussetzung für die nachfolgende transendotheliale Extravasation des Leukozyten, die durch chemokinvermittelte Induktion und Aktivierung von Matrixmetalloproteinasen erleichtert wird (Johnatty 1997, Xia 1996).

Nach erfolgter Extravasation kann der Leukozyt im interstitiellen Gewebe einem chemischen Gradienten gebundener Chemokine folgen. Dieser Vorgang wird als Haptotaxis bezeichnet (Wiedermann 1993). Der aktivierte Leukozyt migriert, diesem Gradienten folgend, zum Zielort im Gewebe.

Sobald der aktivierte Leukozyt am Ort des Gewebeschadens eingetroffen ist, produziert er weitere lokal wirksame Chemo- und Zytokine. Darüber hinaus können Chemokine auch die Freisetzung von Histaminen und Leukotrienen auslösen. Es kommt zu einer Amplifikation im Sinne eines positiven feedbacks durch auto- und parakrine Stimulation. Mit der Zeit stellen

nicht mehr die primär geschädigten Zellen, sondern die inflammatorische Zellpopulation am Entzündungsort die Hauptquelle für Chemokine und Zytokine dar.

Neben diesem proinflammatorischen Effekt werden Chemokinen noch weitere Funktionen zugeschrieben. So wurden beispielsweise verschiedene Chemokine vor allem der CXC-Familie als Wachstumsfaktoren identifiziert (Gewirtz 1995, Koch 1992).

2.4 Chemokine und Chemokinrezeptoren bei Nierenerkrankungen

Seit Entdeckung der Gruppe der Chemokine und Chemokinrezeptoren wurde ihre Bedeutung im Rahmen von Nierenerkrankungen sowohl an Tiermodellen als auch beim Menschen nachgewiesen. Zusammenfassend lassen sich drei grundsätzliche Behauptungen über die Rolle der Chemokine für Erkrankungen der Niere aufstellen.

Alle Zellpopulationen der Niere sind in der Lage, Chemokine zu produzieren.

In in-vitro-Studien wurde gezeigt, dass renale Zellen nicht nur CCL5/RANTES und CCL2/MCP-1, sondern auch CXCL8/IL-8, CXCL1/MIP-2, CXCL10/IP-10 und viele weitere Chemokine unter Stimulation mit Zytokinen, wie z. B. IFN- γ und TNF- α , ausschütten (Prodjuschadjadi 1995, Rovin 1992, Satriano 1993, Wolf 1993/1997). Ebenso sind andere proinflammatorische Stimuli, Sauerstoffradikale, Wachstumsfaktoren, Immunkomplexe und vasoaktive Substanzen wie Angiotensin II Mediatoren der renalen Chemokinausschüttung (Sege-
rer 2000). Sowohl Mesangialzellen als auch Endothelzellen, Tubuluszellen und renale Fibroblasten sind in der Lage, Chemokine zu produzieren und zu sezernieren. Tubuluszellen lassen sich auch durch die Applikation von LPS (Tsuboi 2002), hohe Albuminkonzentrationen (Wang 1999, Zoja 1997) oder die Exposition mit Calciumoxalat- und Calciumphosphatkristallen (Umekawa 2003) zur Chemokinproduktion anregen.

Die Expression von Chemokinen *in vitro* scheint weitgehend unabhängig vom aktiven Stimulus zu sein. So wird die Produktion von CCL5/RANTES sowohl in Mesangialzellen als auch Tubulusepithelzellen und Fibroblasten durch die Stimulation mit TNF- α , TNF- β und IL-1 β stimuliert (Wolf 1995). Gleichzeitig stimulieren TNF- α und IL-1 β die Sekretion von CXCL8/IL-8 durch mesangiale, epitheliale und endotheliale Zellen sowie durch Fibroblasten (Wada 1994).

Es wurden auch in-vivo-Studien zur Verteilung von Chemokinen und Rezeptoren vorgenommen. Am Modell der Immunkomplex-Glomerulonephritis untersuchten Anders und Vielhauer die Expression von Chemokinen und Chemokinrezeptoren. Es konnte die Hochregulation der

mRNA-Level von CCL2/MCP-1, CCL5/RANTES und ihrer Rezeptoren CCR1, CCR2 und CCR5 nachgewiesen werden. Mit Hilfe von in-situ-Hybridisierungstechniken konnte die Expression von CCR5 in den Glomeruli der betroffenen Niere lokalisiert werden (Anders 2001). Die gleiche Arbeitsgruppe untersuchte auch die Expression anhand eines Ureterligaturmodells und konnte in den ligierten Nieren wiederum eine Hochregulation unter anderem von CCL2/MCP-1, CCL5/RANTES und den Rezeptoren CCR1, CCR2 und CCR5 nachweisen (Vielhauer 2001). Am Modell der Lupusnephritis wurde die Relevanz der Chemokinexpression für Autoimmunerkrankungen untersucht. Die Erfahrungen der obigen Experimente wurden bestätigt und die Expression von CCL2/MCP-1, CCL5/RANTES, CXCL10/IP-10 und CCL4/MIP-1 β sowie der Rezeptoren CCR1, CCR2 und CCR5 festgestellt. Die Expression von CCL2/MCP-1 und CCL5/RANTES konnte hauptsächlich im Interstitium nachgewiesen werden (Pérez de Lema 2001).

Die Ergebnisse, wonach renale Zellen *in vitro* verschiedene Chemokine als Antwort auf den gleichen Stimulus produzieren, stehen im Gegensatz zu Beobachtungen *in vivo*, die zeigen, dass man im zeitlichen Verlauf einer Entzündung sehr spezifisch verschiedene Chemokin- und Rezeptorexpressionen und entsprechend infiltrierende Leukozytenpopulationen detektieren kann. Dies ist als Hinweis darauf zu werten, dass die Chemokinproduktion und -wirkung im Kontext der Entzündung gesehen werden muss, ein Prozess, der weitaus komplexer ist als die Situation in der Zellkultur.

Die Chemokinproduktion lässt sich den geschädigten Nierenkompartimenten zuordnen.

Bei Tiermodellen akuter glomerulärer oder tubulointerstitieller Erkrankungen konnten die inflammatorischen Chemokine CCL2/MCP-1, CCL3/MIP-1 α , CCL4/MIP-1 β und CCL5/RANTES in dem jeweils betroffenen Nierenkompartiment nachgewiesen werden (Seegerer 2000). Am Modell der akuten Immunkomplexnephritis konnte gezeigt werden, dass Chemokine ausschließlich im glomerulären Kompartiment exprimiert werden (Anders 2001, Garcia 2003), hingegen wurde diese Expression im Modell der unilateralen Ureterligatur (UUO) im Interstitium nachgewiesen (Vielhauer 2001). Wenn ein primärer glomerulärer Schaden zu einer sekundären interstitiellen Schädigung führt, kommt es zur Expression in beiden Kompartimenten wie z. B. am Modell der murinen Lupusnephritis gezeigt werden konnte (Tesch 1999, Pérez de Lema 2001). Die gewebe- und kompartimentspezifische Expression der Chemokine korreliert somit mit histologischer Schädigung und der Akkumulation chemokinrezeptorpositiver Leukozyten (Anders 2001, Pérez de Lema 2001, Vielhauer 2001).

Dass das spezifische Verteilungsmuster der Chemokinexpression mit der Akkumulation inflammatorischer Zellen und der histologischen Schädigung korreliert, konnte auch an humanen Biopsiestudien gezeigt werden (Anders 2001, Fogo 2001, Vielhauer 2004). So konnten Segerer et al. bei allen untersuchten Nephropathien eine Akkumulation CCR5-positiver Zellen im Interstitium zeigen, deren Verteilungsmuster dem von CD3-positiven T-Zellen entsprach (Segerer 1999). Auch bei der Abstoßungsreaktion renaler Transplantate wurden eine erhöhte Expression der Chemokine CCL5/RANTES, CCL2/MCP-1, CXCL5/ENA-78, CXCL8/IL-8, CCL3/MIP-1 α , CCL4/MIP-1 β , CXCL10/IP-10 und Lymphotactin sowie der Rezeptoren CCR5, CCR2 und CXCR4 in den geschädigten Gewebsbereichen festgestellt. CCL5/RANTES-mRNA wurde sowohl in infiltrierenden Leukozyten als auch in Tubuluszellen und Endothelien gefunden (Nelson 2001). Die gewebespezifische Rekrutierung, aber auch die Suppression einzelner Leukozyten-Subpopulationen führt zur Entstehung sog. spezifischer immunologischer Kompartimente. Neben der beschriebenen Beobachtung bei Nierenerkrankungen wurden im Rahmen von Dünndarmerkrankungen fast ausschließlich CCR9-positive T-Lymphozyten nachgewiesen; diese fanden sich jedoch kaum in anderen Gewebetypen (Kunkel 2000). Kunkel et al. konnten den Rezeptor CCR4 und seinen Liganden CCL17/TARC ähnlich spezifisch der Aktivierung kutaner Lymphozyten zuweisen (Kunkel 2002). Andere Chemokinrezeptoren tragen anscheinend weniger zur Gewebe- als zur Funktionsspezifität bei. So wurde CCR5 im Intestinum (Agace 2000), im Gehirn (Sorensen 1999), der Leber (Shields 1999) und in Synovialflüssigkeit arthritischer Patienten (Qin 1998) gefunden, ebenso CXCR3.

Chemokine sind mitverantwortlich für die Initiation und die Progression chronischer Nierenerkrankungen.

Wie bereits beschrieben, kann der Verlauf chronisch-progressiver Nierenerkrankungen in vier Stufen eingeteilt werden: Initiations-, Amplifikations-, Progressions- und Terminalphase. Chemokine sind an jeder dieser Phasen beteiligt. Dabei sollte beachtet werden, dass Chemokine nicht alleinige Mediatoren des Krankheitsverlaufes sind, sondern mit anderen Zytokinen und Adhäsionsmolekülen ein komplexes System bilden. Sie nehmen in der Resolution oder Progression von Nierenerkrankungen jedoch eine bedeutende Stellung ein. Im Verlauf der akuten Glomerulonephritis geht ein Wegfallen des auslösenden Faktors mit einer Reduktion der Chemokinproduktion intrinsischer Nierenzellen und von Leukozyten einher. Die Reduktion der Leukozytenakkumulation führt damit zur Resolution der Glomerulonephritis (Anders 20001). Die Verminderung der Chemokinproduktion bedeutet hier also eine positive Entwick-

lung im Krankheitsgeschehen. Umgekehrt kann eine vorbestehende Nierenschädigung durch eine lokal gesteigerte Chemokinproduktion zur chronischen Niereninsuffizienz fortschreiten. So konnte die Applikation von CpG-Oligonukleotiden, die bakterieller DNA gleichen, die Expression von Chemokinen und Chemokinrezeptoren bei Mäusen mit ansonsten selbstlimittierender Immunkomplex-Glomerulonephritis steigern und dadurch eine Progression des renalen Schadens herbeiführen (Anders 2003). Diese Beobachtungen legen nahe, dass Chemokine und Chemokinrezeptoren zusammen mit anderen Faktoren wie Hypoxie, Proteinurie und vasoaktiven Substanzen zur persistierenden Leukozyteninfiltration und zum Gewebsdefekt führen und damit eine bedeutende Stellung in Initiation und Progression von Nierenerkrankungen einnehmen.

2.5 Bedeutung der Chemokin- und Chemokinrezeptorantagonisten

Um die Funktion der renal vermehrt exprimierten Chemokine und Chemokinrezeptoren zu untersuchen, wurden Experimente an chemokinrezeptordefizienten Tieren und mit spezifischen Chemokinrezeptor-Antagonisten durchgeführt. Experimente mit dem CCR1-Antagonisten BX471 zeigten an Ureterligaturmodellen (Anders 2002) und bei renalen Transplantationsmodellen (Horuk/Shurey 2001) eine klinische und histologische Befundbesserung durch die pharmakologische Blockade von CCR1. Diese Daten zeigten, dass CCR1 eine wichtige Rolle in der Vermittlung von entzündlichen Erkrankungen im Bereich der Niere spielt.

Für funktionelle Studien am System Chemokine – Chemokinrezeptoren kommen zurzeit folgende Möglichkeiten in Betracht:

2.5.1 Inhibition der Chemokinaktivität

Eine Möglichkeit zur gezielten Neutralisation bestimmter Chemokine ist der Einsatz von Anti-Chemokin-Antikörpern. So gelang es, mittels eines Antikörpers gegen IL-8 im Rahmen eines Modells einer entzündlichen Hautveränderung bei Ratten signifikante therapeutische Erfolge zu erzielen (Yang 1999). Ein Antikörper gegen CCL2/MCP-1 wurde von Lloyd, Minto et al. in einem Modell der nephrotoxischen Serum-Nephritis eingesetzt. Die Blockierung von CCL2/MCP-1 resultierte in einer signifikant niedrigeren interstitiellen Fibrose und verminderte die Bildung extrakapillärer Halbmonde um 50 % (Lloyd 1997).

Eine weitere Möglichkeit der Inhibition von Chemokinen beruht auf der physiologischen Fähigkeit von Chemokinen, eine Bindung mit oberflächenständigen Glykosaminoglykanen ein-

zugehen. In vivo dient diese Bindungsfähigkeit der Schaffung eines haptotaktischen Gradienten. Im Versuch war es wegen dieser Eigenschaft möglich, durch die Verabreichung exogenen Heparins die Bindungsfähigkeit von CXCL8/IL-8 und CCL2/MCP-1 zu beeinträchtigen und damit die Ausbildung eines Chemokingradienten und die Migration von Leukozyten zu unterbinden (Douglas 1997, Ramdin 1998).

2.5.2 Inhibition von Chemokinrezeptoren

Die Blockierung mehrerer Chemokinrezeptoren durch ein einziges Molekül wurde durch die Entdeckung kleiner viraler Proteine ermöglicht. Das mit dem Kaposi-Sarkom assoziierte Herpesvirus 8 (HHV8) erzeugt die Proteine vMIP I-III (viral macrophage inflammatory protein I-III). vMIP I ist Agonist am Rezeptor CCR8 und antagonisiert CCR3 und CCR5. vMIP II hat ein weiteres Spektrum und antagonisiert CXCR4, CCR1, CCR2, CCR5, CCR10, CX3CR und XCR1. vMIP III hat nur eine geringe strukturelle Ähnlichkeit mit vMIP I und II und ist ein Agonist an CCR4 (Kledal 1997). Die Administration von vMIP II verringerte in einem Modell nephrotoxischer Serumnephritis in der Ratte Proteinurie und die interstitielle Akkumulation von Leukozyten signifikant (Chen 1987).

Als weitere Blockierungsmöglichkeit von Chemokinrezeptoren kommt der Einsatz modifizierter Chemokine in Betracht. Die N-terminale Modifikation von Chemokinen durch Hinzufügen oder Deletion von Aminosäuren oder Hinzufügen einer funktionellen chemischen Gruppe kann zu antagonistischen Eigenschaften des veränderten Chemokins führen (Gong 1995, Mack 1998). Die in dieser Weise veränderten Chemokinabkömmlinge AOP-RANTES (Simmons 1997) und Met-RANTES (Proudfoot 1996) konnten ihre protektive Wirkung bereits anhand eines Transplantationsmodells, eines Anti-GBM-Glomerulonephritis-Modells und bei der Anti-Thy-1-Nephritis zeigen. Bei den Glomerulonephritiden fanden sich neben einer geringeren Leukozyteninfiltration und Proteinurie (Anders 2003) auch eine verminderte Ablagerung von Kollagen IV (Panzer 1999). Im Nierentransplantationsmodell reduzierte die Behandlung mit Met-RANTES die immunologische Reaktion auf Epithelien von Gefäßen und Glomeruli (Gröne 1999) und verringerte damit die Abstoßungsreaktion des transplantierten Organs (Proudfoot 1996, Simmons 1997).

Eine neue Möglichkeit der Untersuchung des Chemokin-Chemokinrezeptor-Systems stellt die Transfektion von Zellen oder Geweben mit Plasmiden dar, welche die Sequenz für Chemokinantagonisten tragen. In einem Protein-overload-Modell wurden Rattennieren mit Plasmiden transfiziert, die das Proteinprodukt des CCL2/MCP-1-Antagonist 7ND exprimieren. Im

Vergleich zu den unbehandelten Kontrollnieren kam es zu einer signifikanten Reduktion des Makrophageninfiltrats in den behandelten Nieren sowie zu einer verminderten Anzahl apoptotischer Zellen (Shimizu 2003). In einem anderen Experiment wurden mit einem CCL2/MCP-1-Antagonist transfizierte Fibroblasten in einem Lupus-Nephritis-Modell untersucht. Nach acht Wochen zeigten die Nieren der behandelten Tiere im Vergleich zur Kontrollgruppe eine verminderte Infiltration durch Makrophagen und T-Lymphozyten und geringere histologische Schäden (Hasegawa 2003).

Eine weitere Therapieoption stellte die Entwicklung von Nicht-Peptid-Antagonisten dar. Ein Vertreter der Gruppe der 4-hydroxy-Piperidine und CCR1-Antagonist, BX471 (R-N-[5-chloro-2-[2-[4-[(4-fluorophenyl)-ethyl]-2-methyl-1-piperazinyl]-2-oxoethoxy]-phenyl]urea hydrochloric acid salt) (Berlex,

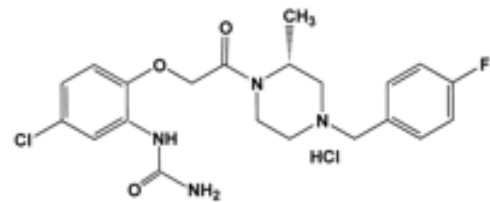


Abbildung 3: Der CCR1-Antagonist BX471

Richmond, USA, Abb. 3), wurde erfolgreich in Transplantationsmodellen von Niere (Horuk/Shurey 2001) und Herz (Horuk/Clayberger 2001) an der Ratte eingesetzt und verlängerte die Überlebensdauer der Transplantate signifikant. Auch bei einem unilateralen Ureterligaturmodell in der Maus wurde die Effektivität des Antagonisten bestätigt. BX471 konnte die Akkumulation inflammatorischer Zellen und renale Fibrose nach einseitiger Ureterligatur signifikant verringern (Anders 2002).

Bindungsstudien zeigten, dass BX471 die CCR1-Liganden CCL7/MCP-3, CCL5/RANTES und CCL3/MIP-1 α mit hoher Affinität vom Rezeptor verdrängen konnte (Hesselgesser 1998). Dadurch konnte bei in-vitro-Experimenten die Verminderung CCR1-vermittelter Effekte wie Kalziuminflux in CCR1-exprimierende Zellen gezeigt werden. Gleichzeitig besteht eine hohe Spezifität der Substanz für den Rezeptor (Liang 2000).

2.6 Fragestellung der Arbeit

Bisherige Arbeiten zeigen, dass der Chemokinrezeptor CCR1 eine wichtige Rolle für die Immigration von Leukozyten in das renale Interstitium besitzt. In das renale Interstitium migrierte Leukozyten sind eine Hauptquelle profibrotischer Zytokine und damit ein Stimulus für Fibroblastenproliferation und die Akkumulation extrazellulärer Matrix. Sie initiieren damit einen fibrotischen Umbau des Nierenparenchyms, der zur chronisch-progressiven Niereninsuffizienz führt.

Bei menschlichen Nephropathien ist die Proteinurie (bei der diabetischen Nephropathie bereits die Mikroalbuminurie) ein wichtiger Risikofaktor für die Progression zur terminalen Niereninsuffizienz. Persistierend erhöhte Urinproteinwerte sind mitverantwortlich für die verstärkte tubuläre Expression von Chemokinen und führen damit zur interstitiellen Fibrose (Eddy 1989). Die Blockade von Chemokinrezeptoren oder von Chemokinen könnte somit zu einer Verlangsamung der Progression zur terminalen Niereninsuffizienz bei proteinurischen Erkrankungen beitragen (Shimizu 2003).

Das Modell der ADR-induzierten Nephropathie ist ein Modell einer toxisch induzierten fokalsegmentalen Glomerulosklerose. Es ist gekennzeichnet durch eine glomeruläre Schädigung mit starker Proteinurie und sekundärer interstitieller Nephritis. Anhand dieses Modells soll in der vorliegenden Arbeit die Rolle von Chemokinen und Chemokinrezeptoren bei der fokalsegmentalen Glomerulosklerose untersucht werden. Ausgehend von Vorbefunden wird postuliert, dass in diesem Modell, das pathophysiologisch für Nierenerkrankungen des Menschen relevant ist, durch Blockade des Chemokinrezeptors CCR1 eine verminderte interstitielle Leukozyteninfiltration sowie eine verminderte Fibrose erreicht werden kann. Zusätzlich soll untersucht werden, ob die Blockade von CCR1 Einfluss auf die primäre glomeruläre Schädigung hat und wie sich eine mögliche Verbesserung des glomerulären Schadens auf die Pathologie des Interstitiums auswirkt.

3. Methoden und Materialien

3.1 Studienprotokoll

Um die benötigte Dosis zur Induktion der ADR-induzierten Nephropathie zu evaluieren, wurden zunächst Dosisfindungsstudien durchgeführt.

Tabelle 4: Dosisfindungsstudien vor Versuchsbeginn

Experiment	Dosis/kg Körpergewicht	Anzahl Injektionen	Histologisches Resultat (Woche 6)
ADR I	11 mg	1	Keine Läsionen
	Kontrolle mit NaCl	1	Keine Läsionen
ADR II	15 mg	1	Fokal segmentale und fokal globale Glomerulosklerose, fokaler tubulointerstitieller Schaden
ADR III	13 mg	1	Fokal segmentale Glomerulosklerose, fokaler tubulointerstitieller Schaden bei 60 % der Tiere
	13 mg	2 (Tag 0 / 14)	Fokal segmentale und fokal globale Glomerulosklerose, fokaler tubulointerstitieller Schaden

ADR I: Zunächst wurde das Experiment den Empfehlungen der Referenzliteratur folgend durchgeführt (Wang 2000). Hierfür wurde männlichen BALB/c-Mäusen eine Dosis von 11 mg ADR pro kg Körpergewicht über die Schwanzvene injiziert. Es wurde wöchentlich Spontanurin gesammelt, das Gewicht bestimmt und nach sechs Wochen Serum gewonnen. Es wurden die Parameter Gewicht, Albuminurie, Serumkreatinin, -harnstoff, -albumin, und -protein evaluiert. Bei keinem der Parameter konnte eine signifikante Veränderung festgestellt werden, mit Ausnahme einer geringen Albuminurie zwischen Woche 2 und 4, die sich bis Woche 6 wieder rückbildete und die auf einen geringen, reversiblen, glomerulären Schaden hinweist. Daneben bestand ein auf den ADR-induzierten Katabolismus zurückzuführender Gewichtsverlust (Tavoloni 1980) in der ADR-Gruppe (Abb. 4 und 5). Die histologische Aufarbeitung ergab lichtmikroskopisch keine pathologischen Läsionen der Nieren ADR-behandelter Tiere sechs Wochen nach ADR-Gabe.

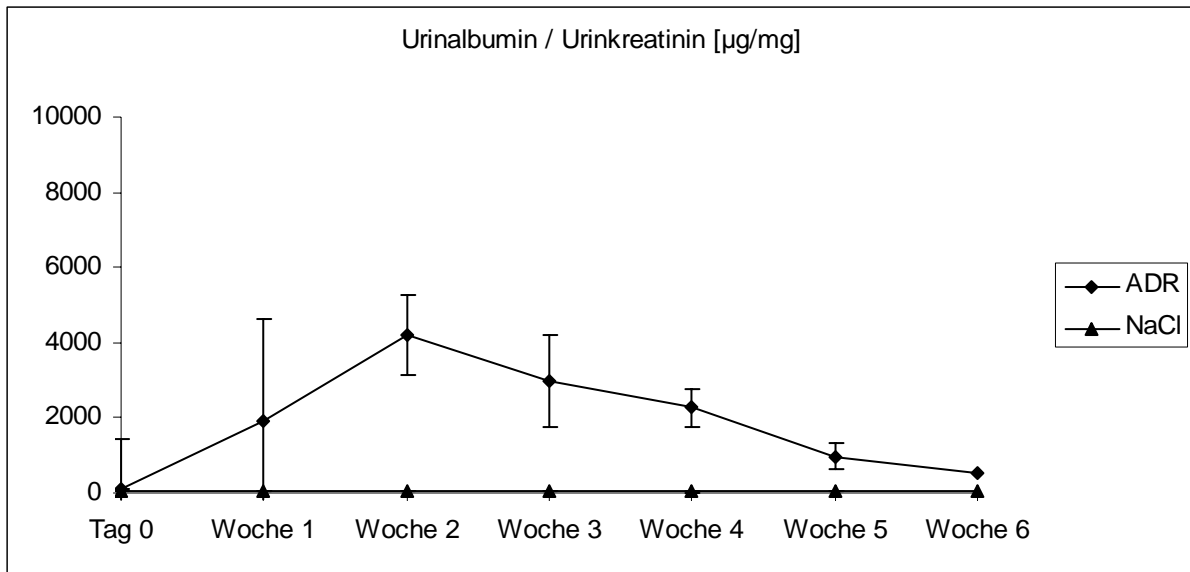


Abbildung 4: Verlauf des Quotienten Urinalbumin / Urinkreatinin im Experiment ADR I. Durch den ADR-induzierten Podozytenschaden besteht eine Albuminurie mit Maximum in Woche 2.

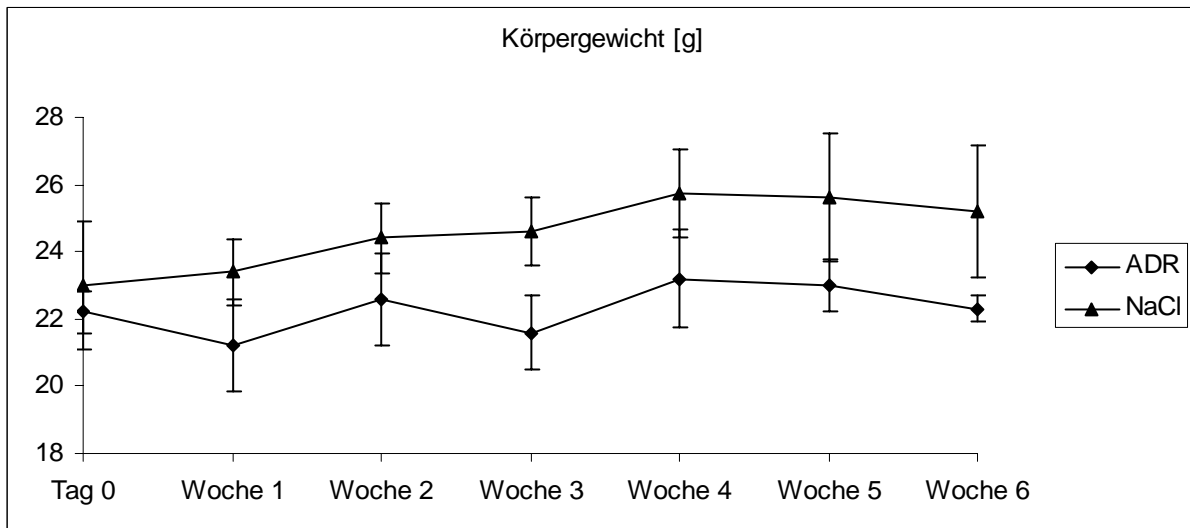


Abbildung 5: Verlauf des Körpergewichts im Experiment ADR I. Bei ADR-behandelten Tieren tritt durch die chemische ADR-Toxizität eine Verminderung des Körpergewichts auf.

ADR II: Das Experiment wurde wiederholt mit einer Dosis von 15 mg/kg. Die Urinalbumin-Werte lagen hier im anfänglichen Verlauf deutlich höher als im vorangegangenen Experiment. Der Versuch konnte jedoch aufgrund der erhöhten Morbidität und steigender Mortalität nur bei einigen Tieren bis zur Woche 6 durchgeführt werden. In der histologischen Aufarbeitung zeigten sich bei den Tieren ausgeprägte glomeruläre fokal-segmentale bis globale Läsionen mit umgebender interstitieller Nephritis. Aufgrund der hohen systemischen Toxizität des ADR in den verabreichten Dosen erschien dieses Versuchsprotokoll jedoch für eine Interventionsstudie nicht geeignet.

ADR III: Um eine geeignete wirksame Dosis bei geringer systemischer Toxizität zu finden, wurde ein weiteres Experiment zur Dosisfindung durchgeführt. Es kam eine Dosis von

13 mg/kg zur Anwendung. Eine weitere Gruppe erhielt am Anfang des Experimentes eine Injektionsmenge von 13 mg/kg verabreicht, nach 14 Tagen wurde eine zweite Injektion gleicher Dosis verabreicht. In dieser Gruppe wurden eine über sechs Wochen persistierende Albuminurie und die homogensten Läsionen evaluiert, bei gleichzeitig vergleichsweise niedriger Mortalität von 10 %.

Ausgehend von diesen Vorversuchen wurde das Studiendesign für die vorliegende Arbeit entworfen. Die Dauer des Experimentes wurde wiederum auf sechs Wochen festgelegt. Die Aufteilung der Versuchsgruppen erfolgte folgendermaßen:

Tabelle 5: Versuchsgruppen des Experimentes

Gruppe, Zahl	Grundbehandlung	Intervention s.c.
A1: ADR n = 7	Injektion von 13 mg/kg ADR, Tag 0 und Tag 14	keine Intervention
A2: NaCl n = 5	Injektion von NaCl, Tag 0 und Tag 14	keine Intervention
B1: ADR+Vehikel n = 5	Injektion von 13 mg/kg ADR, Tag 0 und Tag 14	Injektion von 50 µl Cyclodextrin 3 x tgl. ab Tag 14
B2: ADR+ BX471 n = 5	Injektion von 13 mg/kg ADR, Tag 0 und Tag 14	Injektion von 50 mg/kg BX471 ge- löst in 50 µl Cyclodextrin 3 x tgl. ab Tag 14
B3: NaCl+Vehikel n = 5	Injektion von NaCl, Tag 0 und Tag 14	Injektion von 50 µl Cyclodextrin 3 x tgl. ab Tag 14
B4: NaCl+ BX471 n = 4	Injektion von NaCl, Tag 0 und Tag 14	Injektion von 50 mg/kg BX471 ge- löst in 50 µl Cyclodextrin 3 x tgl. ab Tag 14

Wöchentlich wurde das Gewicht gemessen und Spontanurin gewonnen. Das Experiment wurde nach sechs Wochen mit der Euthanasie der Tiere und der Gewinnung von Serum und Nierengewebe beendet.

3.2 Tierexperimentelle Methodik

3.2.1 Tierhaltung

Für die Experimente wurden männliche Mäuse des Stammes BALB/c mit einem Gewicht von 18 g bis 22 g von der Firma Charles River, Sulzfeld verwendet. Die Tiere wurden in Macro-lon-Typ-III-Käfigen mit Wasser und Futter (mouse diet, Sniff Spezialdiäten GmbH, Soest) ad libidum gehalten. Die Tiere waren in einem Stall untergebracht, in dem eine Temperatur von

20 °C bis 22 °C und eine Luftfeuchtigkeit von 50 % bis 60 % konstant gehalten wurden und in dem ein Hell-Dunkel-Rhythmus von 12 Stunden herrschte.

3.2.2 Intravenöse Injektion von ADR

Für das Experiment wurde kommerziell verfügbare Doxorubicin-Hydrochlorid-Lösung verwendet (Adriblastin® Lösung, Pharmacia & Upjohn, Erlangen). Bei einer Gesamtmenge von 50 mg des Wirkstoffes gelöst in 25 ml lag eine Konzentration von 2 mg/ml vor. Es wurden 13 mg/kg Körpergewicht, bei einem Mausgewicht von 20 g bis 25 g entsprechend zwischen 0,13 und 0,16 ml Lösung, appliziert. Die Applikation erfolgte über die Schwanzvene der Maus mit einer Butterfly-Nadel (Venisystems Butterfly®-27, Abbot Ireland, Sligo, Irland).

3.2.3 Injektion von BX471 und Cyclodextrin

Die Trägerlösung aus 40%igem Cyclodextrin (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen) in ungepufferter Kochsalzlösung wurde durch einen Filter der Porengröße 0,45 µm gefiltert. BX471 wurde in einer Konzentration von 20 mg/ml hinzugefügt. Der pH-Wert wurde mit 1M KOH auf pH 4,5 eingestellt, danach wurde die Lösung erneut gefiltert.

Die Injektion erfolgte dreimal täglich. Dazu wurde eine Rückenfalte der Maus zwischen zwei Finger einer Hand gefasst und in diese Falte je nach Gruppe 50 µl BX471-Lösung (entsprechend 50 mg/kg Körpergewicht), Cyclodextrin-Trägerlösung bzw. physiologische NaCl-Lösung subkutan injiziert.

3.2.4 Urinentnahme

Die vorgenommenen Bestimmungen von Urinalbumin und -kreatinin erfolgten an Spontanurin. Die Entnahme wurde wöchentlich vorgenommen, der Urin in Eppendorf-Reaktionsgefäßen gesammelt und bis zur Bestimmung der Parameter bei -20 °C gelagert.

3.2.5 Gewinnung von Serum

Die Blutentnahme zur Gewinnung von Serum erfolgte vor Euthanasie der Mäuse unter Ethernarkose mit einer heparinisierten Kapillare (Durchmesser 0,8 mm, K & K Laborbedarf, München) aus dem retrobulbären Venenplexus des lateralen Augenwinkels. Durch leichtes Drehen der Kapillare kann der Plexus leicht verletzt und das Blut in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß gesammelt werden. Nachdem ausreichend Blut gewonnen wurde (etwa 500 µl Vollblut) wurde die Kapillare zurückgezogen.

Nach Gerinnung wurde das Vollblut fünf Minuten bei 14000 U/min zentrifugiert (Biofuge 15, Firma Heraeus). Das Serum wurde abpipettiert und bei einer Temperatur von -20 °C bis zur Auswertung gelagert.

3.2.6 Entnahme und Fixation von Gewebe

Nach Euthanasie der Maus durch zervikale Dislokation unter Ethernarkose wurde das Tier an den Extremitäten fixiert und eine mediane Laparotomie durchgeführt. Das Darmkonvolut wurde aus dem Bauchraum luxiert ohne das Lumen zu eröffnen. Die Nierengefäße und der Ureter wurden mit einer spitzen Schere knapp distal des Nierenbeckens abgesetzt und die Nieren stumpf aus dem Retroperitonealraum ausgelöst.

Das Nierengewebe für molekularbiologische Untersuchungen wurde in einem Eppendorf-Gefäß in flüssigen Stickstoff eingebracht und schockgefroren. Das Material wurde anschließend bei einer Temperatur von -80 °C gelagert.

Nierengewebe für die histologische Untersuchung an Paraffinschnitten wurde für die vorliegende Arbeit zunächst in 10%iger gepufferter Formalin-Lösung fixiert und freundlicherweise von Prof. Dr. H.-J. Gröne, Deutsches Krebsforschungszentrum Heidelberg, in Paraffin eingebettet. Material für die elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurde in Glutaraldehyd asserviert.

3.3 Albumin-Bestimmung im Urin

Für die Quantifizierung der Albuminurie wurde das „*Mouse Albumin ELISA Quantitation Kit*“ (Bethyl Laboratories Inc., Montgomery, USA) eingesetzt. Hierfür wurde zunächst eine ELISA-Kunststoffplatte (Eppendorf, Hamburg) mit einem goat-anti-mouse-Albumin-Antikörper in einer Verdünnung von 1:100 inkubiert (60 Minuten). Danach wurde für 30 Minuten

mit 1%iger boviner Serum-Albumin-Lösung geblockt. Im Anschluss daran wurden sechs Standardverdünnungen in einer Konzentration von 15,625 bis 500 ng/ml sowie die zu bestimmenden Proben aufgetragen. Es wurden stets Doppelbestimmungen durchgeführt. Die eingesetzte Konzentration der Proben lag abhängig von der Behandlungsweise und -dauer zwischen 1:100 und 1:500.000. Nach der Inkubationszeit von 60 Minuten wurde ein Peroxidase-konjugierter goat-anti-mouse-Albumin-Antikörper in einer Verdünnung von 1:5000 aufgetragen. Nach weiteren 60 Minuten wurde das Farbsubstrat 2,2'-azino-di-(3-ethyl-benzthiazolin-6-Sulfonsäure) (ABTS) hinzugefügt. Die Farbreaktion wurde nach 30 Minuten mit 1%iger SDS-Lösung (Natriumdodecylsulfat) gestoppt. Die Extinktion der Proben wurde bei einer Wellenlänge von 405 nm photometrisch bestimmt (E-max Precision Microplate Reader, Molecular Devices Corporation, Ismaning). Um bei variabler Harnkonzentration der Versuchstiere vergleichbare Werte zu erhalten, wurde zur Auswertung der Albuminurie der Quotient Albumin/Kreatinin verwendet.

Verwendete Reagenzien:

1. Goat anti-Mouse-Albumin, aff.pur., Bethyl Laboratories, Montgomery, USA
2. Mouse Reference Serum (Albuminkonzentration = 40 mg/ml), Bethyl Laboratories, Montgomery, USA
3. Goat anti-Mouse-Albumin HRP, Bethyl Laboratories, Montgomery, USA
4. Coating Buffer (0,05 M Natriumcarbonat, pH 9,6)
5. Wash Solution (50 mM Tris, 0,14 M NaCl, 0,05 % Tween 20, pH 8,0)
6. Postcoat Solution (50 mM Tris, 0,15 M NaCl, 1 % BSA, pH 8,0)
7. Sample / Conjugate Diluent (50 mM Tris, 0,15 M NaCl, 1 % BSA, 0,05 % Tween 20, pH 8,0)
8. 2,2'-azino-di-(3-ethyl-benzthiazolin-6-sulfonsäure) (ABTS)
9. 1%ige Natriumdodecylsulfatlösung (SDS)

3.4 Laborchemische Bestimmungen

Kreatinin, Harnstoff, Protein, Albumin und Cholesterin im Serum sowie Urinkreatinin wurden mittels Auto-Analyser im Routinelabor der Medizinischen Klinik Innenstadt, München, bestimmt.

3.5 Histologische Methoden

3.5.1 Beschichten der Objektträger

Die für die vorliegende Arbeit verwendeten Objektträger wurden mit einer APES-Lösung (3-Aminopropyltriethoxysilan, 5 ml APES auf 245 ml Azeton) beschichtet, um ein Abschwimmen der Gewebsschnitte während der Vorbehandlung in den Antigenfreilegungsschritten (s. u.) zu verhindern. Die Objektträger der Marke SuperFrost Plus (Firma Menzel-Gläser, Braunschweig) wurden hierfür zunächst zweimalig für fünf Minuten in Azeton eingebracht, danach für weitere fünf Minuten in die APES-Lösung eingestellt. Nach zweimaligem Spülen in entmineralisiertem Wasser wurden die Objektträger über Nacht getrocknet und bei Raumtemperatur trocken gelagert.

3.5.2 Herstellen der Gewebsschnitte

Die Schnitte wurden auf einem Rotationsmikrotom (Leica RM 2125, Leica Microsystems, Bensheim) angefertigt. Die 4 µm dünnen Paraffinschnitte wurden auf der Oberfläche eines Wasserbades (40 °C bis 42 °C) abgelegt und von dort direkt auf APES-beschichtete Objektträger überführt. Nach Trocknung der Träger wurden die Schnitte über Nacht im Wärmeschrank bei 60 °C zwischengelagert und anschließend bei Raumtemperatur trocken aufbewahrt.

3.5.3 Entparaffinieren der Gewebsschnitte

Die Schnitte wurden zunächst zweimal 12 Minuten in Xylol entparaffiniert. Da die Arbeit in hydrophilem Milieu erfolgte, wurde beim anschließenden Wässern der Schnitte die aufsteigende Alkoholreihe nach folgendem Protokoll umgekehrt:

- 3 Minuten, Ethanol 100 %
- 1,5 Minuten, Ethanol 96 %
- 30 Sekunden, Ethanol 75 %
- 30 Sekunden, Ethanol 50 %

Schließlich wurden die Schnitte in entmineralisiertes Wasser eingebracht und zügig weiterbearbeitet.

3.5.4 Entwässern von Gewebsschnitten

Beim Entwässern von histologischem Material kam die aufsteigende Alkoholreihe nach folgendem Protokoll zum Einsatz:

30 Sekunden, Ethanol 50 %

30 Sekunden, Ethanol 70 %

1,5 Minuten, Ethanol 96 %

3 Minuten, Ethanol 100 %

Danach wurden die Objektträger bis zur endgültigen Konservierung mit Deckgläschen in Xylol eingebracht.

3.5.5 PAS-Färbung

Die PAS-Färbung dient zum Nachweis von Aldehydgruppen, die durch Oxidation von 1,2-Glykolen mit Perjodsäure gebildet werden, mittels Schiff'schem Reagenz. PAS-positive Materialien wie Muzine stellen sich rosa bis purpurrot dar, durch die Gegenfärbung mit Hämatoxylin stellen sich die Zellkerne blau dar.

Die Präparate wurden zunächst nach o. g. Methode entparaffiniert. Die Oxidation erfolgte durch Einstellen in 1%ige Perjodsäure für einen Zeitraum von 10 Minuten. Nach Spülen mit entmineralisiertem Wasser wurden die Schnitte für 3 bis 5 Minuten in Schiff'sche Reagenz eingebracht. Anschließend wurde zunächst für eine Minute mit Sulfitlewasser gespült und dann 10 Minuten gewässert. Vor erneutem Spülen in fließendem Wasser erfolgte die Gegenfärbung mit Hämalaun. Schließlich wurden die Präparate in aufsteigender Alkoholreihe und mit Xylol entwässert und mit Deckgläschen versehen.

Verwendete Reagenzien:

1. 1%ige Perjodsäure-Lösung (1g Perjodsäure in 100 ml Aqua dest.)
2. Schiff'sche Reagenz (40 ml Schiff'sche Reagenz + 60 ml Aqua dest.)
3. SO₂-haltige Spülflüssigkeit (200 ml Aqua dest., 10 ml 10%iger Natriumbisulfit-Lösung versetzt, 10 ml HCl 1M)
4. Hämalaun-Lösung

3.5.6 Silberfärbung

Die Silberfärbung dient dem Nachweis von argentaffinen Retikulin- und Nervenfasern. In der vorliegenden Arbeit wurde sie zur Quantifizierung der interstitiellen Fibrosierung verwendet. Hierfür wurde ein kommerziell erhältliches Färbesystem verwendet (Bio-Optica, Mailand, Italien).

Nach Inkubation mit Kaliumpermanganat und saurem Aktivierungspuffer für fünf Minuten kam es zur Oxidation der entparaffinierten Gewebeschnitte. Überschüssiges Permanganat wurde anschließend mit Oxalsäure ausgewaschen. Eine dreiminütige Inkubation mit Eisen-Ammoniumsulfat-Lösung diente der Sensibilisierung, bevor sich in einem weiteren Schritt die Silberionen einer ammoniakalischen Silberlösung an die Retikulinfasern anlagern konnten. Anschließend wurde das gebundene Silber mittels einer neutralen Formalinlösung zu metallischem Silber reduziert. Nicht reduziertes Silber wurde mit Natriumthiosulfat ausgewaschen. Schließlich wurden die entwässerten Schnitte mit Deckgläschen versehen.

Verwendete Reagenzien (alle: Bio-Optica, Mailand, Italien):

1. Kaliumpermanganat
2. saurer Aktivierungspuffer
3. Oxalsäure-Lösung
4. Eisen-Ammoniumsulfat-Lösung
5. Ammoniakalische Silberlösung
6. neutrale Formalin-Lösung
7. Natriumhyposulfit-Lösung

3.5.7 Immunhistologie

Die für die vorliegende Arbeit verwendeten Immunfärbemethoden basieren auf der Avidin-Biotin-Methode, welche die hohe Affinität der beiden Substanzen zueinander nutzt. Das anzu-färbende Molekül wird mittels eines unmarkierten Primärantikörpers gebunden. Der Sekundärantikörper ist spezifisch gegen die F_c-Region des Primärantikörpers gerichtet und mit einem Biotinmolekül gekoppelt. Als Label wurde ein Peroxidase-konjugierter Avidin-Biotin-Komplex eingesetzt, der sich mit freien Avidin-Bindungsstellen an den biotinmarkierten Sekundärantikörper anlagern kann. Die Peroxidase des Labelkomplexes wurde mit dem Chromogen AEC (3-Amino-9-ethylcarbazol) sichtbar gemacht.

3.5.7.1 Antigenfreilegung

Um die zu markierenden Gewebsantigene für die Primärantikörper besser verfügbar zu machen, wurden in unserer Arbeitsgruppe zwei verschiedene Antigenfreilegungsmethoden eingesetzt.

Die Antigenfreilegung in der Mikrowelle hat in der Immunhistologie verschiedene Anwendungsmöglichkeiten aufgetan. So konnten an Paraffinschnitten Antigene nachgewiesen werden, die zuvor nur in Frisch- und Gefriermaterial färbbar waren. Zudem handelt es sich um eine sehr einfache und zeitsparende Methode. Die Schnitte wurden in mikrowelleneigneten Kunststoffküvetten in Citratpuffer eingebracht und dreimal je 2,5 Minuten bei 600 W Leistung erhitzt. Zwischen den Erhitzungszyklen wurde der Flüssigkeitsverlust in der Küvette mit entmineralisiertem Wasser aufgefüllt, um eine Freilegung und Austrocknung der Gewebsschnitte zu vermeiden.

Bei der Antigenfreilegung im Autoklaven wird eine Proteinspaltung durch Temperatur und Druck erreicht. Dazu wurden die Gewebsschnitte in Citratpuffer für 30 Minuten bei 2 bar autoklaviert (Autoklav 23, Melag Medizintechnik, Berlin). Vor der Weiterverarbeitung wurden die Schnitte etwa 15 Minuten im Citratpuffer abgekühlt.

3.5.7.2 Blockierungsschritte

Bei immunhistologischen Methoden kommen verschiedene Blockierungsschritte zum Einsatz. Sie dienen dazu, endogene Substrate zu eliminieren, die zu einem falsch-positiven Ergebnis führen könnten. Darunter fallen vor allem endogene Peroxidase, endogenes Avidin und endogenes Biotin, die mit Sekundärantikörper, Label oder Chromogen Bindungen eingehen könnten und somit zu falsch-positiven Ergebnissen führen würden. Bei bestimmten Antikörpern wurde Magermilchlösung zur Blockierung unspezifischer Proteinbildungsstellen eingesetzt. Folgende Substanzen kamen für die vorliegende Arbeit zum Einsatz:

Tabelle 6: Verwendete Blockierungssubstrate

Substanz	blockiert	Inkubationsdauer	Hersteller
Peroxidase Blocking Reagent	Endogene Peroxidase	8 min	DAKO Peroxidase Blocking Reagent, DAKO Corporation, Carpinteria, USA
Avidinlösung	Endogenes Avidin	15 min	Avidin/Biotin Blocking Kit, Vector Laboratories, Burlingame, USA
Biotinlösung	Endogenes Biotin	15 min	Avidin/Biotin Blocking Kit, Vector Laboratories, Burlingame, USA
4%ige Magermilch-Lösung	Unspezifische Protein-bindungsstellen	20 min	0,4 g Magermilchpulver (Firma Merck, Darmstadt) in 10 ml PBS

3.5.7.3 Färbeprotokoll

Nach der Entparaffinierung der Gewebeschnitte schließt sich die Antigenfreilegung an (s. o.). Die so vorbereiteten Proben wurden – je nach verwendetem Antikörper – den entsprechenden Blockierungsschritten unterzogen. Zwischen allen Einzelschritten wurde jeweils für 5 Minuten in PBS gewaschen. Nach dem Blocken wurde das benötigte Volumen – 20 µl im Fall von murinen Nieren – des entsprechend verdünnten Primärantikörpers hinzugegeben und für eine Stunde inkubiert. Nach Waschen in PBS wurde für 30 Minuten mit dem gleichen Volumen des Sekundärantikörpers und nach einem weiteren Waschschrift mit dem Label-Komplex ebenfalls für 30 Minuten inkubiert. Das Chromogen AEC wurde hinzugefügt und der Erfolg unter dem Mikroskop kontrolliert. Die Färbereaktion wurde bei gewünschter Signalintensität durch Einbringen in PBS gestoppt. Nach 10 Minuten wurden die Schnitte zur Gegenfärbung für 30 Sekunden in Häkalaunlösung gefärbt und mit reichlich Leitungswasser gespült. Nach weiteren 10 Minuten konnten die Präparate unter Verwendung des Fixans Aquatech mit Deckgläschen versehen werden. Tab. 7 führt alle verwendeten Primärantikörper mit den entsprechenden Parametern für Antigenfreilegung, Blockierung und Verdünnung auf.

Tabelle 7: Für die Immunhistologie angewandte Primärantikörper

Antigen	Antigenfreilegung	Blockierung	Verdünnung	Hersteller	Sekundär-AK
CD45	Mikrowelle mit Citratpuffer	Peroxidaseblock Avidin-Biotinblock Magermilchblock	1 : 100	Pharmingen, San Diego, USA	A-Rat 1 : 100 Santa Cruz Bio- technology, Santa Cruz, USA
CD3	Autoclav mit Citratpuffer	Peroxidaseblock Avidin-Biotinblock	1 : 50	Serotec, Ox- ford, England	A-Rat 1 : 100 Santa Cruz Bio- technology, Santa Cruz, USA
CCL2/ MCP1	Mikrowelle mit Citratpuffer	Peroxidaseblock Avidin-Biotinblock Magermilchblock	1 : 100	*	A-Rabbit 1 : 100 Vector Laborato- ries, Burlingame, USA
CCL5/ RANTES	Mikrowelle mit Citratpuffer	Peroxidaseblock Avidin-Biotinblock	1 : 50	Peprtech, Rocky Hill, USA	A-Rabbit 1 : 100 Vector Laborato- ries, Burlingame, USA
FSP1	Autoclav mit Citratpuffer	Peroxidaseblock Avidin-Biotinblock	1 : 500	**	A-Rabbit 1 : 100 Vector Laborato- ries, Burlingame, USA
ER-HR3	Autoclav mit Citratpuffer	Peroxidaseblock Avidin-Biotinblock	1 : 100	BMA, Augst, Schweiz	A-Rat 1 : 100 Santa Cruz Bio- technology, Santa Cruz, USA

* Der Primärantikörper gegen CCL2/MCP-1 wurde nach bekanntem Protokoll hergestellt (Anders 2001).

** Der FSP-1 Antikörper wurde freundlicherweise von F. Strutz, Göttingen, zur Verfügung gestellt (Strutz 1995).

3.5.8 Morphometrische Auswertung der histologischen Präparate

Die Bestimmung des Ausmaßes der Glomerulosklerose wurde mittels PAS-Färbung durchgeführt. Mit einem Lichtmikroskop der Firma Leica (Leitz DMR, Leica Microsystems, Bensheim) wurden mittels einer Digitalkamera (Leica DC300, Leica Microsystems, Bensheim) für jedes Tier 20 zufällig ausgewählte PAS-gefärbte Glomeruli bei 400facher Vergrößerung fotografiert. Die Analyse der so gewonnenen Bilddaten erfolgte mit der Software Adobe Photoshop 6.0, welche die quantitative Zählung von Bildpunkten eines festgelegten Farbtönen erlaubt. Der Umriss der Glomeruli wurde in den Bilddaten festgelegt, die Anzahl der Bildpunkte innerhalb dieser Umrandung wurde als Maß glomerulärer Fläche genutzt. Durch die Bestimmung der Bildpunkte in dem PAS-typischen roten Farbton durch die Software konnte ein

Index aus PAS-positiven Anteilen an der glomerulären Gesamtfläche gebildet werden. Dieser Index wurde zur Evaluation des Ausmaßes der Glomerulosklerose benutzt.

Zur Ermittlung des interstitiellen Volumens wurden mittels Silberfärbung je Tier vier Nierenschnitte angefärbt. Aus jedem Schnitt wurden fünf zufällig ausgewählte und nicht überlappende Gesichtsfelder (Vergrößerung 200fach) fotografiert. Über jedes Bild wurde ein Raster mit 100 gleichmäßig verteilten Punkten gelegt. Jeder Punkt, der über dem interstitiellen Raum lag, wurde gezählt, so dass jedem Bild ein Prozentwert zwischen 0 % und 100 % zugeordnet werden konnte. Aus den je 20 Gesichtsfeldern jedes Tieres wurde der Mittelwert berechnet. Die Auswertung erfolgte verblindet ohne Kenntnis der Gruppenzugehörigkeit der analysierten Tiere.

3.5.9 Evaluation der Zahl inflammatorischer Zellen

Zur Beurteilung der Infiltration mit inflammatorischen Zellen wurden immunhistochemische Färbungen verwendet (s. o.). Dabei wurden zur Färbung verschiedener Zellpopulationen folgende Antigene angefärbt:

Tabelle 8: Primärantikörper zur Differenzierung von Leukozytensubpopulationen

Epitop	Primärantikörper	Zellpopulation
CD45	Pharmingen, San Diego, USA	Leukozyten
ER-HR3	BMA Biomedicals, Augst, Schweiz	Makrophagen
CD3	Serotec, Oxford, England	T-Lymphozyten

Von jedem Tier wurden vier Nierenschnitte gefärbt. Pro Schnitt wurden fünf zufällig ausgewählte Gesichtsfelder (Vergrößerung 400fach) aus einem pathologischen Fokus am Mikroskop beurteilt und die Zahl signalpositiver Zellen gezählt. Aus den je 20 Einzelwerten eines Tieres wurde der Mittelwert gebildet. Die Auswertung erfolgte verblindet nach Überkleben der Identifikationsnummern.

3.5.10 Evaluation der Fibroblastenzahl

Die Fibroblastenzahl wurde analog zur Evaluation der Zahl inflammatorischer Zellen ausgewertet. Für die immunhistochemische Färbung wurde der Fibroblasten-spezifische Marker FSP-1 (fibroblast specific protein 1, Strutz 1995) markiert und angefärbt.

3.6 In-situ-Hybridisierung

Die in-situ-Hybridisierung wurde freundlicherweise von Herrn Dr. Volker Vielhauer durchgeführt. Es wurde hierbei die Expression von Chemokin-mRNA an Nierenschnitten von ADR- und NaCl-behandelten Tieren untersucht. Hierfür wurden ³⁵S-markierte Riboproben für murines CCL2/MCP-1 und CCL5/RANTES eingesetzt. Die Hybridisierung wurde an paraffinierten Gewebsschnitten von 4 µm Dicke vorgenommen wie an anderer Stelle beschrieben (Vielhauer 2001).

3.7 Zellkultur und Zellseparation

Weiterhin wurden Untersuchungen an definierten Zelllinien durchgeführt. Hierfür war die Gewinnung und Separation dieser einzelnen Zelltypen erforderlich, die freundlicherweise von Herrn Dr. Vaclav Eis durchgeführt wurde.

Aus mechanisch zerkleinertem murinem Milzgewebe wurden Makrophagen und T-Zellen mit der Technik der magnetischen Zellseparation gewonnen. Hierfür wurden die Zellen in einer Zellsuspension entweder direkt mit Antikörper-konjugierten metallischen Partikeln (MicroBeads, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) markiert oder mit FITC-markierten konventionellen Antikörpern, die mit anti-FITC-MicroBeads (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) gebunden wurden. In mehreren Waschschritten konnten die so markierten Zellen dann in Trennungssäulen (MS separation columns, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) von anderen Zelltypen und Verunreinigungen getrennt werden.

Zur Isolation renaler Fibroblasten wurden kleine Teile renalen Nierengewebes von BALB/c Mäusen unter sterilen Bedingungen in DMEM (Invitrogen, Karlsruhe), versetzt mit 10%igem hitzeinaktiviertem fetalem Kalbsserum (Invitrogen, Karlsruhe) und 1%igem Penicillin-Streptomycin (DMEM-C10, Invitrogen, Karlsruhe), 21 Tage lang kultiviert. Adhärenente Zellen wurden mit 1,5mM EDTA vom Inkubationsgefäß gelöst und durch immunomagnetische Separation (s. o.) und negativer Selektion von Leukozyten getrennt. Nach diesen Trennungsschritten lagen die Zellen in einer Reinheit von > 95 % vor.

Eine Tubulusepithel-Zelllinie (Haverty 1988) wurde in DMEM-C10 angezüchtet.

Die Zelllinien wurden vor der Stimulation für 12 Stunden ohne Zugabe von weiteren Substanzen inkubiert. Danach wurden Epithelzellen mit LPS 0,1 µg/ml und renale Fibroblasten mit TGF-β (1 ng/ml, R&D Biosystems, Wiesbaden-Nordenstadt) stimuliert und für 8 Stunden inkubiert.

3.8 RNA-Isolation

Für die Isolierung von Ribonukleinsäure aus dem Gewebe und aus Einzelzellen wurde die Methode nach Chomczynski in leicht veränderter Form wie unten beschrieben verwendet (Chomczynski 1987). Die Extraktion von RNA aus Zellkulturzellen und mittels Magnetseparation gewonnener Zellen erfolgte mit dem kommerziellen System RNeasy (Qiagen, Hilden). Sowohl für die RNA-Isolation als auch für die RNase Protection Assays wurden zur Zerstörung von RNA-degradierenden Ribonukleasen Reaktionsgefäße und Lösungen benutzt, die mit 0,1 % Diethylpyrocarbonat (DEPC) behandelt wurden. DEPC inaktiviert Ribonukleasen. Da DEPC aber auch RNA per se durch Carboxymethylierung degradiert, war es nötig, die Lösungen und Gefäße vor Gebrauch auf eine Temperatur von über 100 °C zu erhitzen, um das DEPC wieder zu zerstören.

Bei der Extraktion der RNA aus Gewebeproben wurde das schockgefrorene Nierengewebe in 3 ml Solution D (siehe Standardlösungen) eingebracht. Mittels eines Gewebdissektors (Ultra-Turrax T25, IKA-Labortechnik, Staufen) wurden das Gewebe mechanisch zerkleinert und die Zellen aufgebrochen.

Durch Zugabe von 300 µl 2M Natriumacetat wurde ein pH-Wert von etwa 4,0 eingestellt, bei dem die zu extrahierende RNA in die Phase des nun zugegebenen Phenols (3 ml, Aqua-Roti-Phenol, Roth, Karlsruhe) übergang. Anschließend erfolgte eine Proteinfällung mit 0,6 ml eines Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisches im Verhältnis 49 : 1.

Nach Emulsifikation des Ansatzes und Inkubation für 15 Minuten auf Eis wurden die Phasen durch Zentrifugation aufgetrennt (14.000 rpm, 4°C, 15 Minuten). Die obere Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß abpipettiert, wobei sorgsam darauf geachtet wurde, dass die Interphase (= Proteinanteile der lysierten Zellen) nicht mit abgenommen wurde.

Durch Zugabe von 3 ml Isopropanol wurde die RNA gefällt und konnte nach 30minütiger Inkubation bei -20 °C und Zentrifugation (6.000 rpm, 4 °C, 15 Minuten) als Pellet am Boden

des Reaktionsgefäßes gesehen werden. Der Überstand wurde abgegossen und das Pellet in 3 ml Solution D in Lösung gebracht.

Ein weiterer Fällungsschritt folgte, wiederum mit 3 ml Isopropanol, dann 30minütige Inkubation bei -20 °C. Nach Zentrifugation (14.000 rpm, RT, 15 Minuten) wurden erneut der Überstand abgegossen und das Pellet mit 1 ml 80%igem Ethanol in DEPC-Wasser in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Danach erneute Zentrifugation (14.000 rpm, 4 °C, 5 Minuten).

Der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert, ohne das jetzt durchsichtige Pellet zu berühren. Das Pellet wurde in 100 µl DEPC-Wasser gelöst. Die gelöste RNA wurde bei -80 °C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert.

Zur Evaluation der Konzentration von Ribonukleinsäuren wurde je 1 µl des RNA-Isolats mit 99 µl Wasser verdünnt. Gemessen wurde bei einer Wellenlänge von $\lambda = 260$ nm im Photometer (Beckmann Instruments, München). Die gemessene optische Dichte wurde multipliziert mit dem Verdünnungsfaktor 100 und dem Faktor 40 (1 OD entspricht bei einer Wellenlänge von 260 nm 40 µg/ml), um die Konzentration der RNA in µg/ml zu erhalten.

3.9 RNase Protection Assay (RPA)

Ein RNase Protection Assay stellt eine hochempfindliche und spezifische Methode zur Detektion und Quantifizierung von mRNA-Spezies dar. Das Prinzip basiert auf der Möglichkeit, die Ziel-RNA durch Hybridisierung mit einer überlappenden Antisense-RNA vor enzymatischem Abbau zu schützen. Nur die nach Hybridisierung mit der markierten Probe doppelsträngigen Abschnitte der Ziel-RNA bleiben im Ansatz vor der Spaltung durch die eingesetzten RNasen geschützt und können als Fragmente definierter Länge nach elektrophoretischer Auftrennung detektiert und quantifiziert werden.

3.9.1 Synthese der Riboprobe

Für die vorgenommenen Untersuchungen wurde ein kommerzieller template-Mix, bestehend aus linearisierter Plasmid-DNA verschiedener Chemokine, eingesetzt (RiboQuant multi Probe, BD Pharmingen, Hamburg). Das eingesetzte template enthielt DNA für die Liganden CCL1/TCA-3, CCL2/MCP-1, CCL3/MIP-1 α , CCL4/MIP-1 β , CCL5/RANTES und CCL11/Eotaxin. Das Template wurde durch die T7-Polymerase transkribiert, wobei das radioaktiv markierte UTP ($\alpha^{32}\text{P}$ -UTP, 3000 Ci/mmol, NEN, Köln) in die Riboprobe eingebaut wurde, so

dass das Isotop nach erfolgter Hybridisierung autoradiografisch detektierbar war. Dieser Schritt geschah in folgendem Ansatz:

- 4 µl 5xTSC-Buffer
- 2 µl 0,1M DTT (Pharmingen, Hamburg)
- 0,5 µl RNAsin (Pharmingen, Hamburg)
- 4 µl ACG-Mix (Pharmingen, Hamburg)
- 1 µl 0,1mM UTP (Pharmingen, Hamburg)
- 0,5 µl template
- 5 µl $\alpha^{32}\text{P}$ -UTP
- 2,5 µl H₂O-DEPC
- 0,5 µl T7-RNA-Polymerase (Pharmingen, Hamburg)

Der Ansatz wurde dann für 45 Minuten bei 37 °C inkubiert. Dadurch wird die Template-DNA transkribiert und wird somit zur Riboprobe. Nach Inkubation wurde die Riboprobe durch 15minütigen DNase-Verdau bei 37 °C von DNA-Kontaminationen befreit:

- 3 µl 10xDNAse Puffer (Pharmingen, Hamburg)
- 1 µl tRNA (10mg/ml) (Pharmingen, Hamburg)
- 24 µl H₂O-DEPC
- 2 µl RNase-free-DNase (Quiagen, Hilden)

Nach Zugabe von 1 µl Stop Solution (Quiagen, Hilden) und 150 µl H₂O-DEPC wurde die Riboprobe mittels Phenolextraktion gereinigt: 100 µl Aqua-Roti-Phenol und 100 µl Chloroform/Isoamylalkohol 49 : 1 ließen die Probe nach Zentrifugation (5 Minuten bei 14.000 rpm) in die obere Phase übergehen, die sorgfältig abpipettiert werden konnte. Nach der Fällung mit 100 µl 7,5 M Ammoniumacetat (Fluka, Buchs, Schweiz) und 750 µl Ethanol wurde erneut zentrifugiert, der Überstand verworfen, das Pellet in Ethanol 80 % gewaschen und weitere 5 Minuten zentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend in 20 µl HYBE-Puffer gelöst. Nach Messung im Szintillationszähler (Tri-Carb 1500, Packard, Frankfurt) wurde die Probe mit HYBE-Puffer auf einen Wert von 300.000 cpm/µl verdünnt.

3.9.2 Hybridisierung

Die RNA-Proben wurden in einer Vakuumzentrifuge (Speed Vac, Bachofer, Reutlingen) dehydriert. Die dehydrierten Proben (10 µg für Chemokin-RPA) wurden in 8 µl HYBE-Puffer versetzt. Als Kontrollansatz dienten 10 µg tRNA. Jeder Probe wurden 2 µl des Riboproben-Ansatzes zugegeben. Es folgte ein Denaturierungsschritt von 5 Minuten bei 90 °C, danach wurden die Proben für 12 bis 16 Stunden bei 56 °C inkubiert.

3.9.3 RNase-Verdau

Für 10 Proben wurde folgender RNase-Mix angesetzt:

- 1 ml RNase buffer (Pharmingen, Hamburg)
- 3,86 µl RNase A (Pharmingen, Hamburg)
- 6 µl RNase T1 (Pharmingen, Hamburg)

Jeder Probe wurden 100 µl des Mixes zugegeben, danach für 45 Minuten bei 30 °C inkubiert.

3.9.4 Proteinase-K-Verdau

Mit dem Verdau durch Proteinase K werden im Reaktionsansatz vorhandene Enzyme deaktiviert. Für 10 Proben wurde folgender Proteinase-K-Mix angesetzt:

- 156 µl Proteinase-K-buffer
- 12 µl Proteinase K
- 12 µl yeast tRNA 2mg/ml (alles Pharmingen, Hamburg)

Jeder Probe wurden 18 µl des Ansatzes zugegeben, danach für 15 Minuten bei 37 °C inkubiert.

3.9.5 Extraktion der RNA mit Phenol

Jeder Probe wurden 65 µl Phenol und 65 µl Chloroform/Isoamylalkohol 49 : 1 hinzugefügt. Nach 5minütiger Zentrifugation ging die RNA in die obere Phase über, von der 120 µl abpipettiert wurden.

3.9.6 Fällung der RNA mit Ammoniumazetat

Durch Zugabe von 120 µl 4M Ammoniumazetat und 650 µl Ethanol 100 % wurden RNA und Proteine gefällt. Nach einstündiger Inkubation auf Eis wurde für 15 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und das Pellet in 500 µl Ethanol 80 % gewaschen. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet 5 bis 10 Minuten getrocknet. Der Schritt wird durch Lösen in 4 µl gel-loading-buffer (Pharmlingen, Hamburg) abgeschlossen.

3.9.7 Gießen des Sequenziergels

Die benötigten Glasplatten wurden mit Alkohol gereinigt und von Fettrückständen befreit. Die Innenseiten der Platten wurden mit DichlorSilan (Roth, Karlsruhe) eingerieben. Ein Silikon Schlauch wurde U-förmig zwischen einer vollen und einer U-förmig ausgeschnittenen Platte platziert. In den entstandenen Hohlraum wurde der Gelansatz gegossen, bestehend aus:

- 10 ml Konzentrat
- 35 ml Verdünner
- 5 ml Pufferkonzentrat
- 300 µl 10%iges NH₄-Persulfat
- 50 µl TEMED (alles Roth, Karlsruhe)

Am oberen Rand der Kammer wurde ein Plastikkamm eingelegt, der die Aussparungen zum Platzieren der Proben schuf. Innerhalb von 30 bis 60 Minuten war das Gel auspolymerisiert und einsatzbereit.

3.9.8 Vorbereiten der Gelkammer und Durchführung der Gelelektrophorese

Die Pufferkammern wurden mit TBE-Puffer gefüllt. Um das Gel zu strukturieren, wurde nach Entfernen des Taschenkammes für 30 Minuten ein Vorlauf mit 50 Watt vorgenommen. Anschließend wurden die Proben mit der Pipette vorsichtig in die Taschen eingebracht; als Referenzen wurden einige Bahnen mit verschiedenen Verdünnungen der Riboprobe angelegt. Der Gellauf wurde für ein bis zwei Stunden bei 50 Watt durchgeführt. Anschließend wurde die obere Glasplatte vorsichtig vom Gel getrennt und das Sequenziergel auf Chromatographie-Papier (Whatman, Maidstone, England) platziert und in Klarsichtfolie eingehüllt. Unter Vakuum wurde das Gel im Gelrockner (Model 583 Gel Dryer, Bio Rad, München) für zwei Stunden bei 80 °C getrocknet. Die Intensität der spezifischen Banden wurde in einem Phosphor-Imager (Storm 840 PhosphorImager, Molecular Dynamics, Sunnyvale, USA) bestimmt und mit der Software Image Quant (Amersham Biosciences, Freiburg) ausgewertet. Die relative Expression der Chemokine wurde auf die Expression des Housekeeping-Gens GAPDH bezogen.

3.10 Real-time-PCR

Die Expression von mRNA für den Chemokinrezeptor CCR1 wurde in extrahierter RNA der Nieren der mit ADR und NaCl behandelten Tiere untersucht. Zur Evaluation der zellspezifischen Expression dieser mRNA wurden zudem Makrophagen, T-Zellen und renale Fibroblasten isoliert und untersucht.

Die isolierte RNA aus Nierengewebe und Einzelzellen wurde mit DNase I behandelt (RNase-Free DNase Set, Qiagen, Hilden), um DNA-Kontaminationen zu beseitigen. 2 µg der so vorbehandelten RNA wurden mittels reverser Transkriptase, gewonnen aus dem Moloney-Maus-Leukämie-Virus (Superscript, Life Technologies, Karlsruhe), in cDNA überführt. Von jeder Probe wurde die gleiche Menge ohne Transkription als Negativkontrolle eingesetzt. Die Real-time-PCR wurde freundlicherweise von Frau Karin Frach (Arbeitsgruppe Dr. M. Kretzler, Medizinische Poliklinik der LMU, München) an einem TaqMan ABI 7700 Sequence Detection System (PE Biosystems, Weiterstadt) mit hitzeaktivierter Taq-DNA-Polymerase (Amplitaq Gold, PE Biosystems, Weiterstadt) durchgeführt, wie an anderer Stelle bereits beschrieben (Cohen 2002). Hierfür wurden die folgenden Oligonukleotid-Primer verwendet:

Tabelle 9: Verwendete Oligonukleotid-Primer

	CCR1	GAPDH
sense	5'-TTAGCTTCCAT GCCTGCCTTATA-3'	5'-CATGGCCTTC CGTGTTCTTA-3'
antisense	5'-TCCACTGCTT CAGGCTCTTGT-3'	5'-ATGCCTGCTT CACCACCTTCT-3'
internal fluorescence labeled probe	5'-ACTCACCGTACCTG TAGCCCTCATTTCCT-3' [FAM]	5'-CCCAATGTGTCC GTCGTGGATCTGA-3' [VIC]
Hersteller	PE Biosystems, Weiterstadt	PE Biosystems, Weiterstadt

3.11 Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung wurde das Programm SPSS 11.0 (SPSS Inc., Chicago, USA) verwendet. Von den gesammelten Daten wurden jeweils Mittelwert und Standardabweichung bzw. Standardfehler des Mittelwerts bestimmt. Signifikanzniveaus wurden mit einem zweiseitigen t-test bestimmt. Wurden mehr als zwei Gruppen miteinander verglichen, kam die post-hoc-Korrektur nach Bonferroni zur Anwendung. Statistische Signifikanz wurde ab einem p-Wert kleiner 0,05 akzeptiert.

3.12 Lösungen und Reagenzien

3.12.1 Chemikalien

ABTS	Boehringer Mannheim
Aceton	Merck, Darmstadt
AEC	Biogenex, San Ramon, USA
APES	Sigma, Deisenhofen
Aquatex	Merck, Darmstadt
Bovines Serumalbumin	Roche Diagnostics, Mannheim
Chloroform	Merck, Darmstadt
DEPC	Fluka, Buchs, Schweiz
Ethanol	Merck, Darmstadt
Formalin	Merck, Darmstadt
Glutaraldehyd	Merck, Darmstadt
Hämalaun, Mayers	Merck, Darmstadt
Isoamylalkohol	Merck, Darmstadt
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kaliumhydroxid	Merck, Darmstadt
Label	Biogenex, San Ramon, USA
Magermilch	Merck, Darmstadt
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumbisulfit	Sigma, Deisenhofen
Natriumcarbonat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumcitrat	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat	Merck, Darmstadt
Na ₂ EDTA	Calbiochem, SanDiego, USA

Salzsäure 5N	Merck, Darmstadt
Schiff'sches Reagenz	Sigma, Deisenhofen
Tris	Roth, Karlsruhe
Tween	Fluka, Buchs, Schweiz
Wasserstoffperoxid	DAKO, Hamburg
Xylol	Merck, Darmstadt

3.12.2 Lösungen

10x Citratpuffer

110 mM Natriumcitrat
in 1 l ddH₂O
mit 2N NaOH auf pH 6 einstellen

HYBE-Puffer

0.5 M Natriumphosphat
7 % SDS
1 mM EDTA
1 % BSA
auf pH 7.2 einstellen

20x PBS

2,74 M NaCl
54 mM KCl
30 mM KH₂PO₄
130 mM Na₂HPO₄
in 1 l ddH₂O
mit HCl auf pH 7,5 einstellen

Solution D

94,528 g Guanidinium-Thiozyanat
6,64 ml Natriumcitrat, pH7
10 ml Sarcosyl 10 %
Mit Aqua dest auf 200 ml auffüllen
Vor Gebrauch 7,2 µl/ml 14,3 M
β-Mercaptoethanol zufügen

10x TBE-Puffer

108 g TRIS
55 g Borsäure
9,4 g Na₄EDTA
in 1 l ddH₂O

TSC-Puffer

50 mM Natriumcitrat
150 mM NaCl
auf pH 6,5 einstellen

4. Ergebnisse

4.1 Charakterisierung des Modells der ADR-induzierten Nephropathie

4.1.1 Die ADR-induzierte fokal-segmentale Glomerulosklerose führt zur Albuminurie und zu einer sekundären interstitiellen Fibrose

Durch die nephrotoxische Wirkung des ADR-Moleküles kam es zur Induktion eines Podozytenschadens, der durch elektronenmikroskopische Aufnahmen gezeigt werden konnte (Abb. 6). Nach der Injektion von ADR kam es zu einer Schädigung der podozytären Fußfortsätze. Aufgrund dieser Destabilisierung der Filtrationsbarriere kam es zur gesteigerten Filtration höhermolekularer Proteine und damit zur Albuminurie und Hypoproteinämie (Tab. 10, Abb. 7 und 8). ADR-behandelte Tiere entwickelten ab Woche 2 eine signifikante, anhaltende Albuminurie, die nach 6 Wochen das ca. 500fache im Vergleich zur Kontrollgruppe betrug. Der maximale Wert wurde 4 Wochen nach Beginn des Experimentes erreicht.

Tabelle 10: Funktionelle und histologische Parameter ADR-behandelter und Kontrolltiere (Woche 6)

Parameter, Woche 6	A1: ADR (n = 7)	A2: NaCl (n = 5)	Signifikanzniveau
Urinalbumin/Urinkreatinin [µg/mg]	18969 ± 10461	30,9 ± 11,4	p = 0,003
Serumalbumin [g/dl]	2,3 ± 0,2	3,1 ± 0,2	p = 0,025
Serumprotein [g/dl]	4,6 ± 0,4	5,2 ± 0,3	p = 0,007
Serumcholesterin [mg/dl]	233,3 ± 102,6	95,4 ± 9,5	p = 0,02
Serumharnstoff [mg/dl]	42,0 ± 16,1	27,4 ± 3,4	p = 0,077
PAS-positives Areal [% glomerulärer Fläche]	44,0 ± 2,1	16,3 ± 0,3	p < 0,001
Interstitielles Volumen [%]	19,2 ± 2,5	6,1 ± 0,5	p < 0,001
CD45-positive Zellen/Gesichtsfeld	7,5 ± 0,2	0,3 ± 0,1	p < 0,001
CD3-positive Zellen/Gesichtsfeld	3,0 ± 0,2	0,3 ± 0,03	p < 0,001
ER-HR3-positive Zellen/Gesichtsfeld	5,9 ± 0,2	0,2 ± 0,1	p < 0,001
FSP-1-positive Zellen/Gesichtsfeld	5,7 ± 0,3	0,4 ± 0,1	p < 0,001

Das Serumcholesterin war bei den ADR-behandelten Tieren im Sinne eines nephrotischen Syndromes im Durchschnitt um das 2,5fache erhöht (Tab. 10, Abb. 7). Der Serumalbuminwert war signifikant um 26 %, der Serumproteinwert um 13 % erniedrigt. Der Retentionsparameter Harnstoff zeigte im Serum keinen signifikanten Unterschied zwischen behandelten und nicht behandelten Gruppen (Abb. 7), allerdings lag tendenziell eine Steigerung um das 1,9fache bei einem Signifikanzniveau von $p = 0,077$ vor.

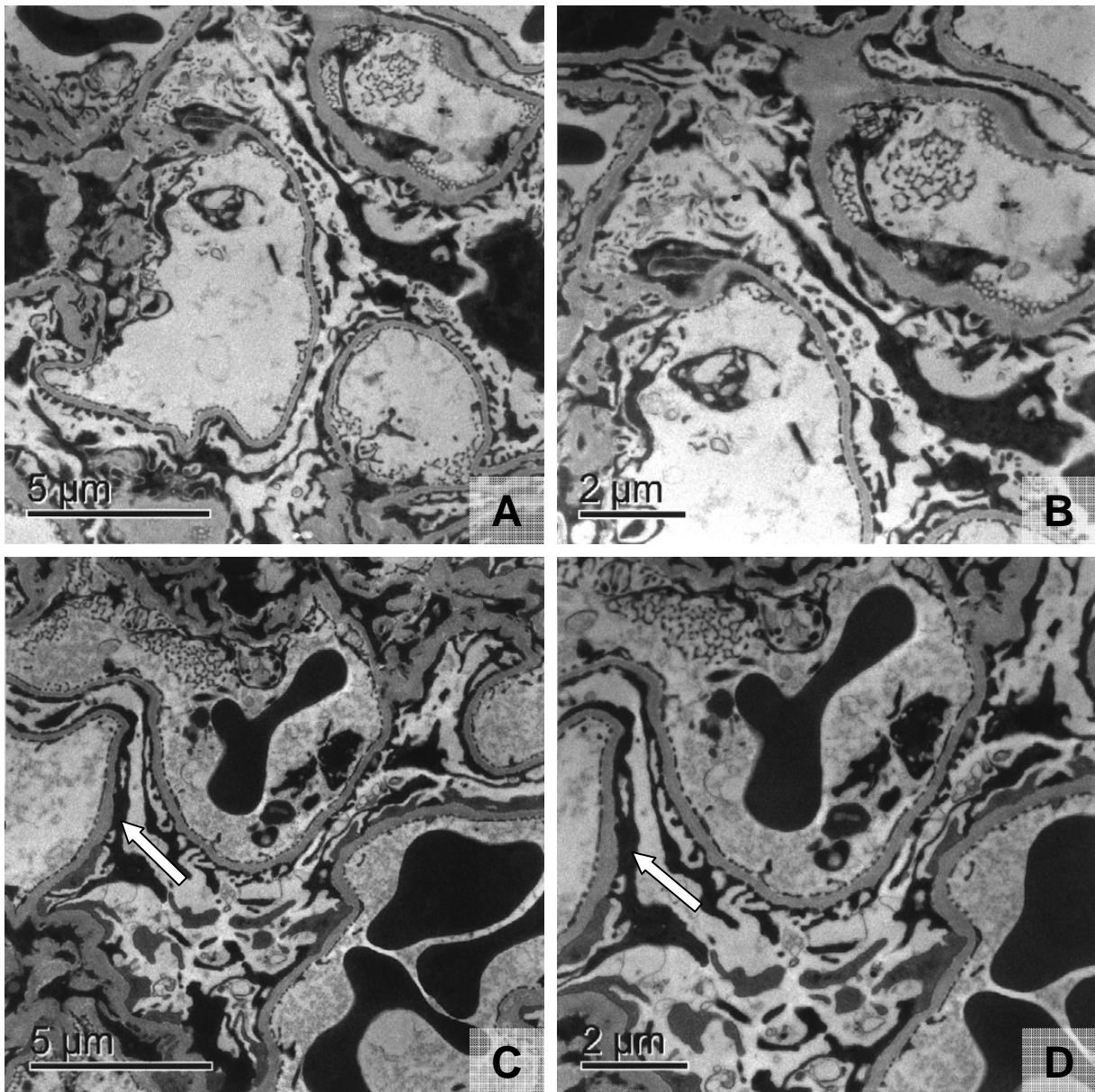


Abbildung 6: Elektronenmikroskopische Aufnahme von 1) unbehandelten Tieren der Kontrollgruppe, Vergrößerungen 7100fach (A) und 10400fach (B) und 2) ADR-behandelten Tieren, Vergrößerungen 7100fach (C) und 10400fach (D). Die Pfeile weisen auf den Podozytenschaden mit Verschmelzung der Fußfortsätze. (Die elektronenmikroskopischen Präparate und Abbildungen wurden freundlicherweise durch Herrn Prof. H.J. Gröne, Heidelberg, angefertigt.)

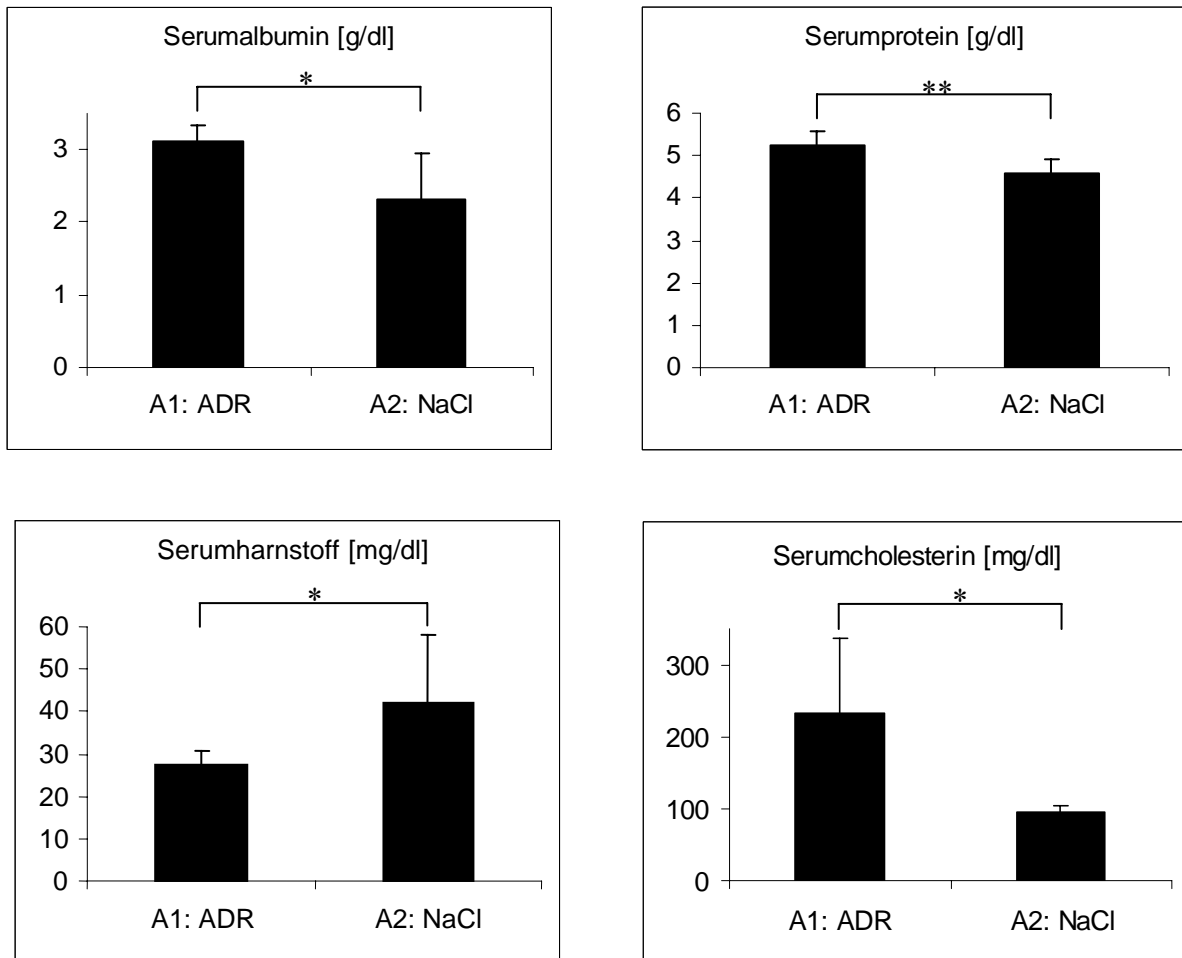


Abbildung 7: Serumwerte des Charakterisierungsexperimentes zum Zeitpunkt Woche 6.

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$

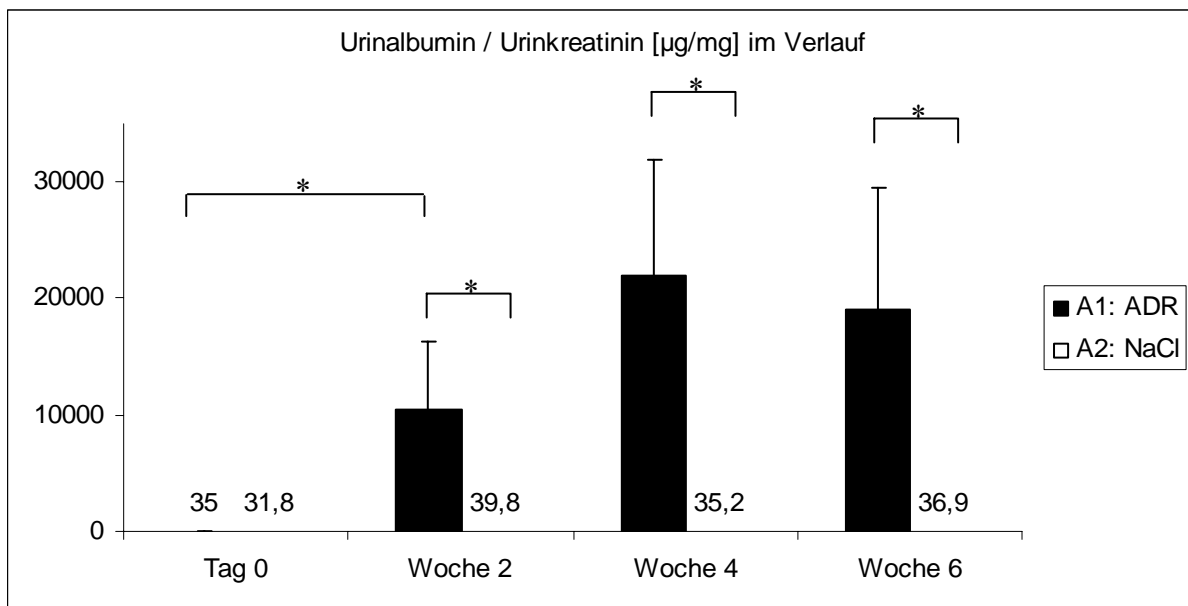


Abbildung 8: Verlauf des Quotienten Urinalbumin / Urinkreatinin im Charakterisierungsexperiment.

* $p < 0,01$

Die Auswertung der konventionellen Lichtmikroskopie nach sechs Wochen zeigte bei der Gruppe, die zwei ADR-Injektionen zu 13 mg/kg erhalten hatte, eine fokal-segmentale Glomerulosklerose mit segmentaler Vermehrung hyaliner Matrix, verbunden mit einem Kollabieren der ortständigen Kapillarschlingen in kortikalen Glomeruli. Die morphometrische Quantifizierung glomerulärer PAS-positiver Ablagerungen zeigte eine 2,7fache Vermehrung PAS-positiven Materials im Unterschied zu den Kontrolltieren (Abb. 9).

Der glomeruläre Schaden wurde von interstitiellen Veränderungen begleitet. Bei allen ADR-behandelten Tieren kam es in fokalen Läsionen zur Tubuluszellatrophie mit Verlust des Bürstensaumes, tubulärer Dilatation und zur Vermehrung des interstitiellen Volumens. Das Ausmaß des interstitiellen Volumens wurde anhand mikroskopischer Aufnahmen aus zufällig ausgewählten Gesichtsfeldern bestimmt. Durch Verwendung eines Gitters mit 100 Punkten konnten den bestimmten Gewebekompartimenten repräsentative Prozentwerte zugewiesen werden (Abb. 10).

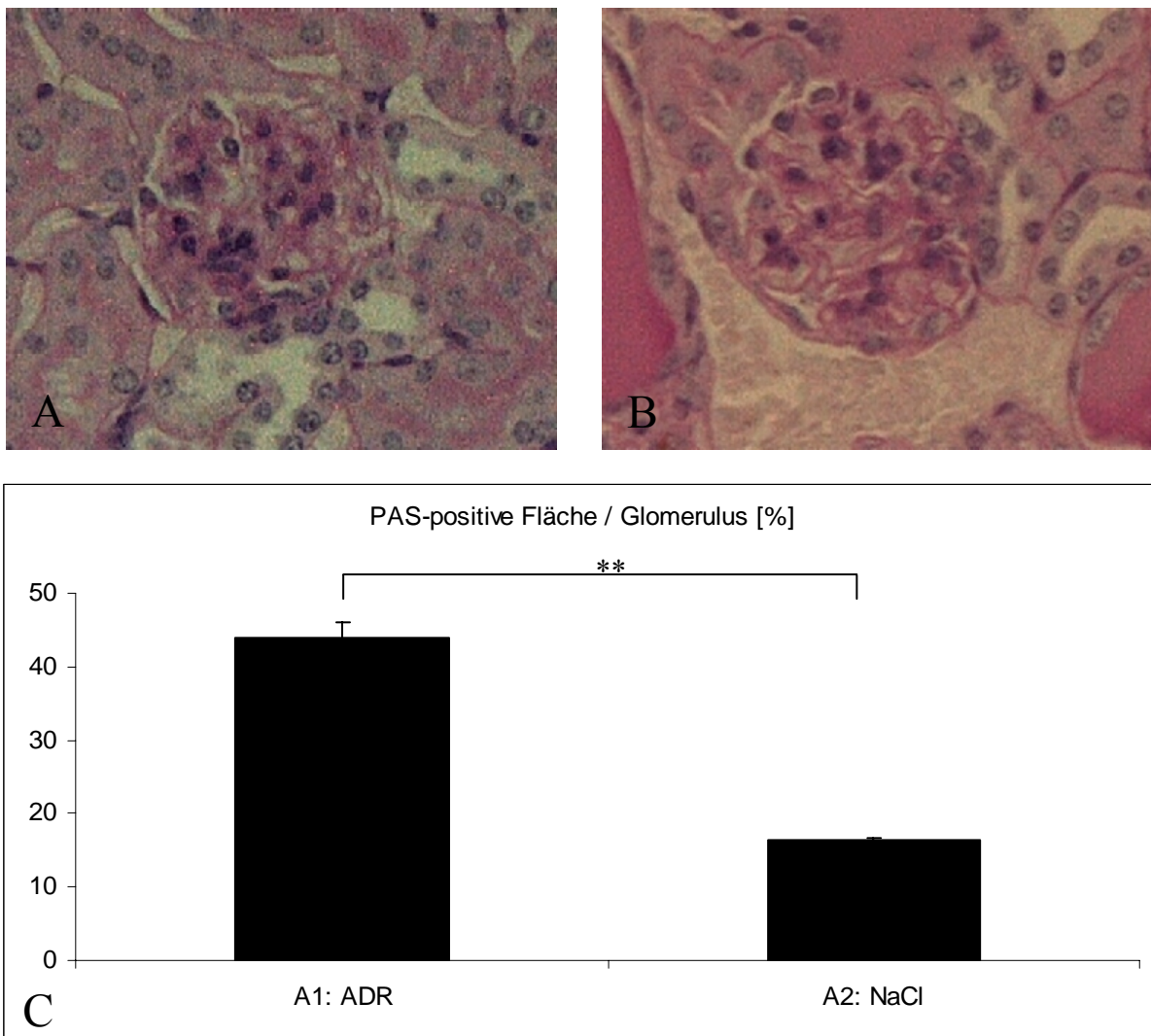


Abbildung 9: PAS-Färbung ADR-behandelter Tiere (A) und der Kontrollgruppe (B). Diagramm (C) zeigt den Anteil glomerulären PAS-positiven Materials beider Gruppen. ** $p < 0,01$

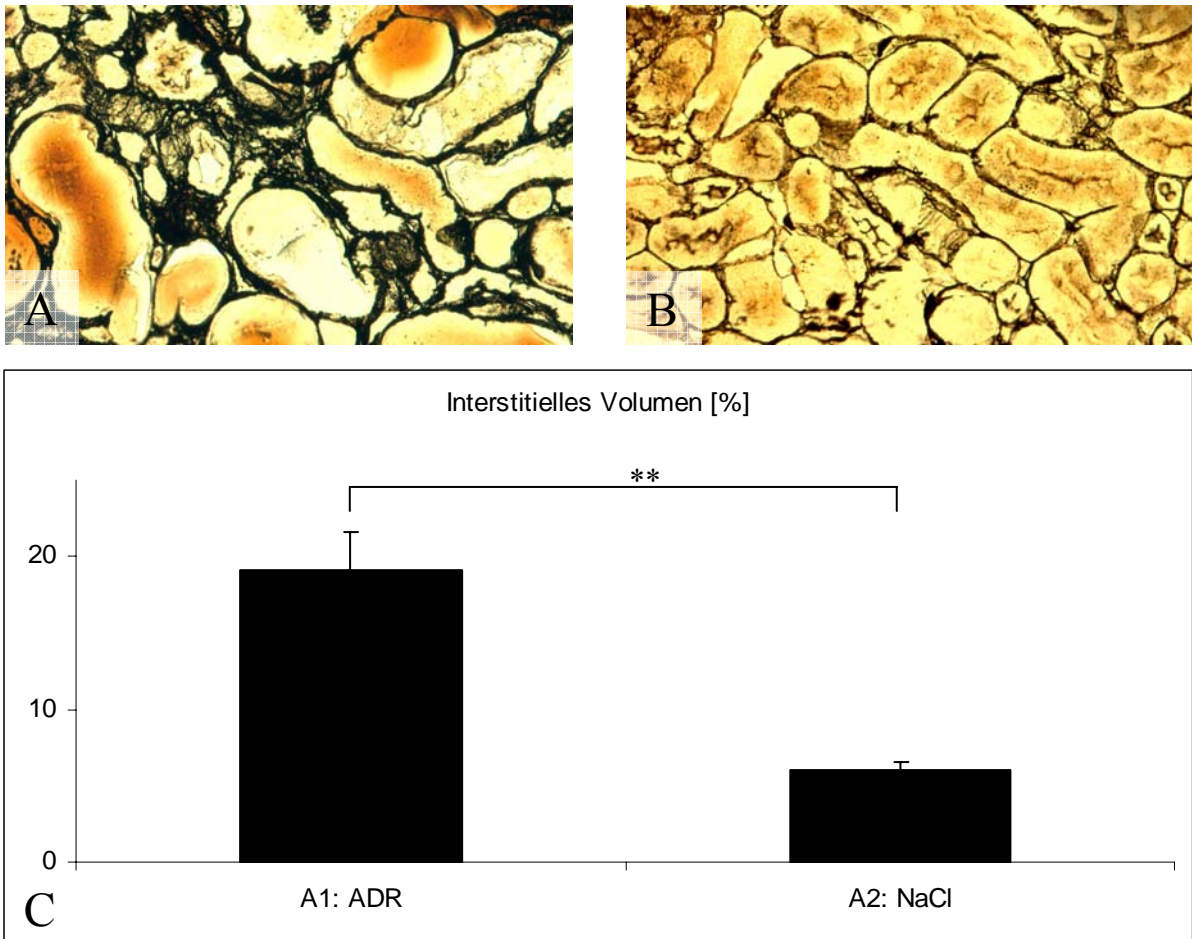


Abbildung 10: Silberfärbung ADR-behandelter Tiere (A) und der Kontrollgruppe (B). Diagramm (C) zeigt den Anteil interstitiellen Volumens in zufällig ausgewählten Gesichtsfeldern bei beiden Gruppen. ** $p < 0,01$

Mittels immunhistologischer Techniken konnte die Anzahl CD45-positiver Leukozyten, CD3-positiver T-Lymphozyten, ER-HR3-positiver Makrophagen und FSP1-positiver Fibroblasten in interstitiellen Läsionen quantifiziert werden. Dabei erhöhte sich die Anzahl der signalpositiven interstitiellen Zellen um das 25fache (CD45), 11fache (CD3), 27fache (ER-HR3) bzw. 15fache (FSP-1) (Abb. 11 bis 14).

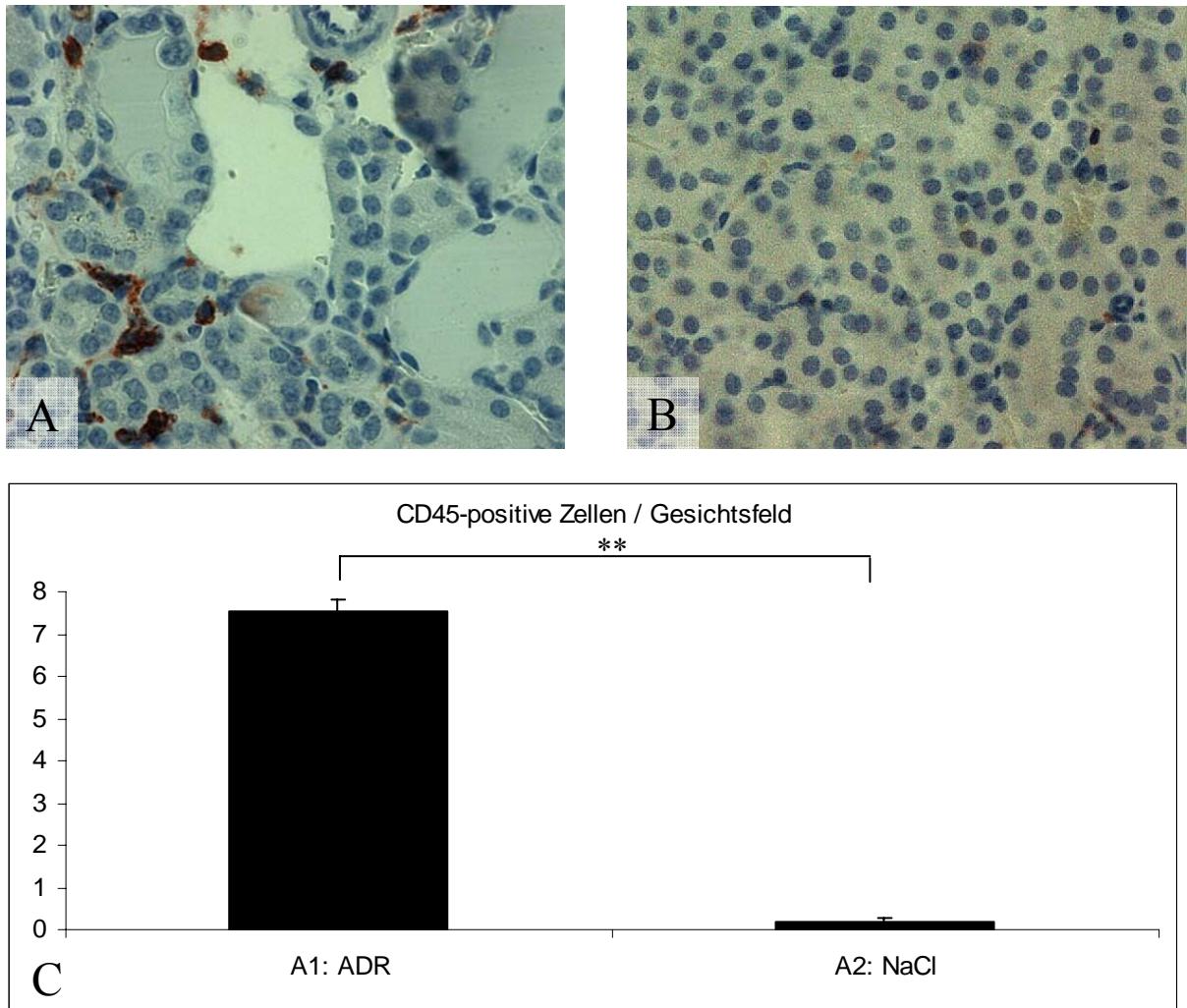


Abbildung 11: Immunhistologie CD45-positiver Zellen ADR-behandelter Tiere (A) und der Kontrollgruppe (B). Diagramm (C) zeigt die Zahl CD45-positiver Zellen pro Gesichtsfeld in zufällig ausgewählten interstitiellen Läsionen. ** $p < 0,01$

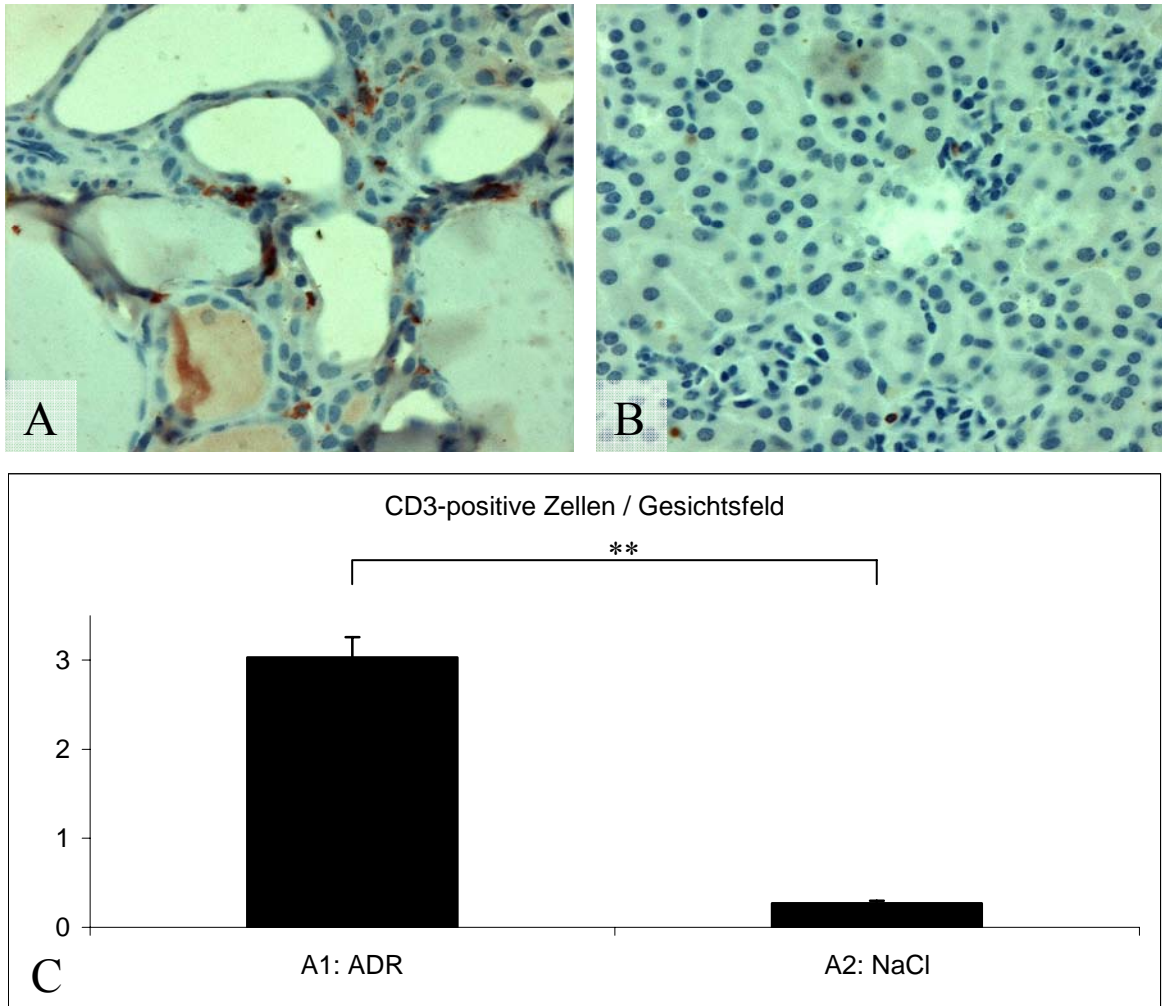


Abbildung 12: Immunhistologie CD3-positiver Zellen ADR-behandelter Tiere (A) und der Kontrollgruppe (B). Diagramm (C) zeigt die Zahl CD3-positiver Zellen pro Gesichtsfeld in zufällig ausgewählten interstitiellen Läsionen. **p < 0,01

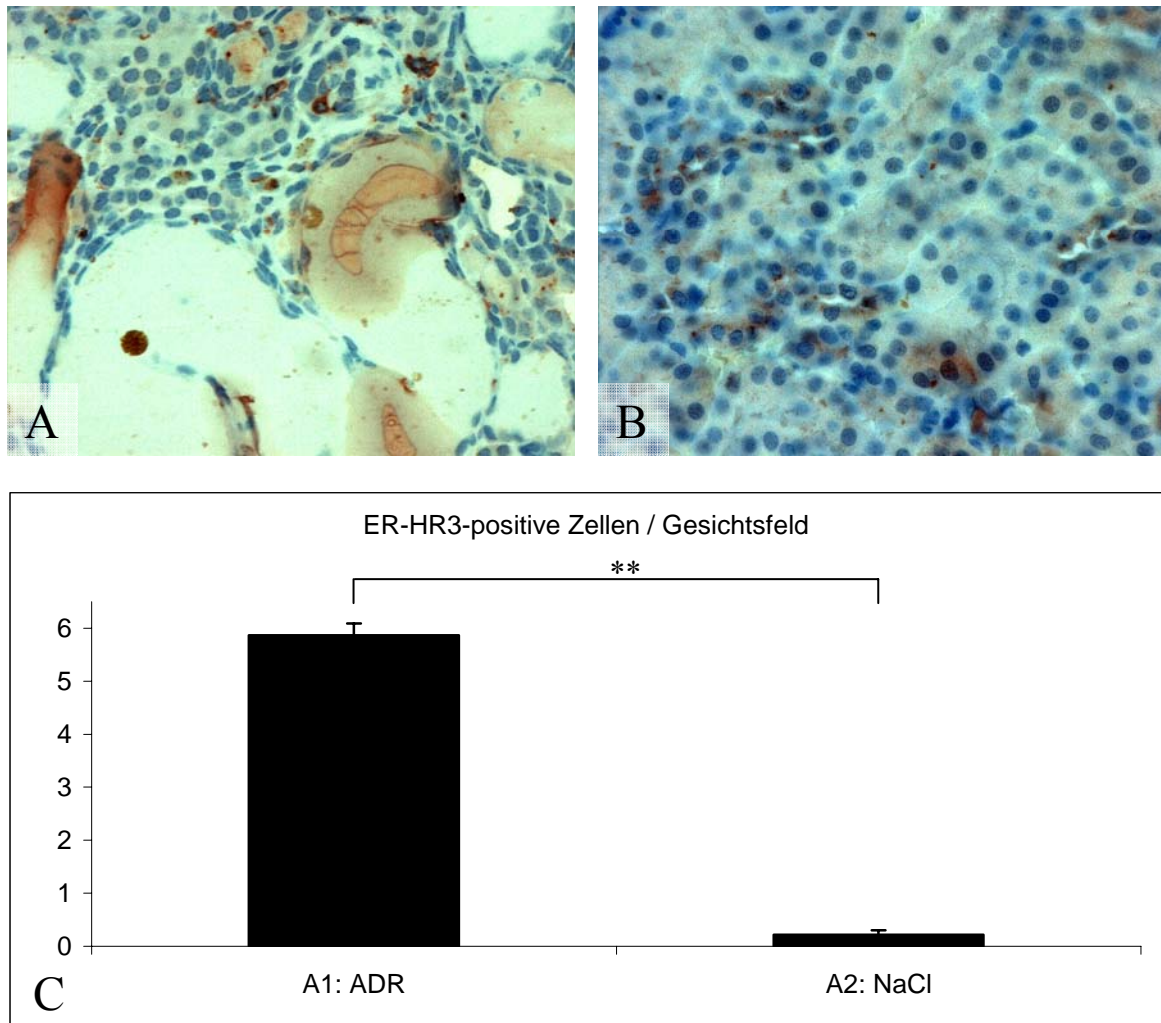


Abbildung 13: Immunhistologie ER-HR3-positiver Zellen ADR-behandelter Tiere (A) und der Kontrollgruppe (B). Diagramm (C) zeigt die Zahl ER-HR3-positiver Zellen pro Gesichtsfeld in zufällig ausgewählten interstitiellen Läsionen. ** $p < 0,01$

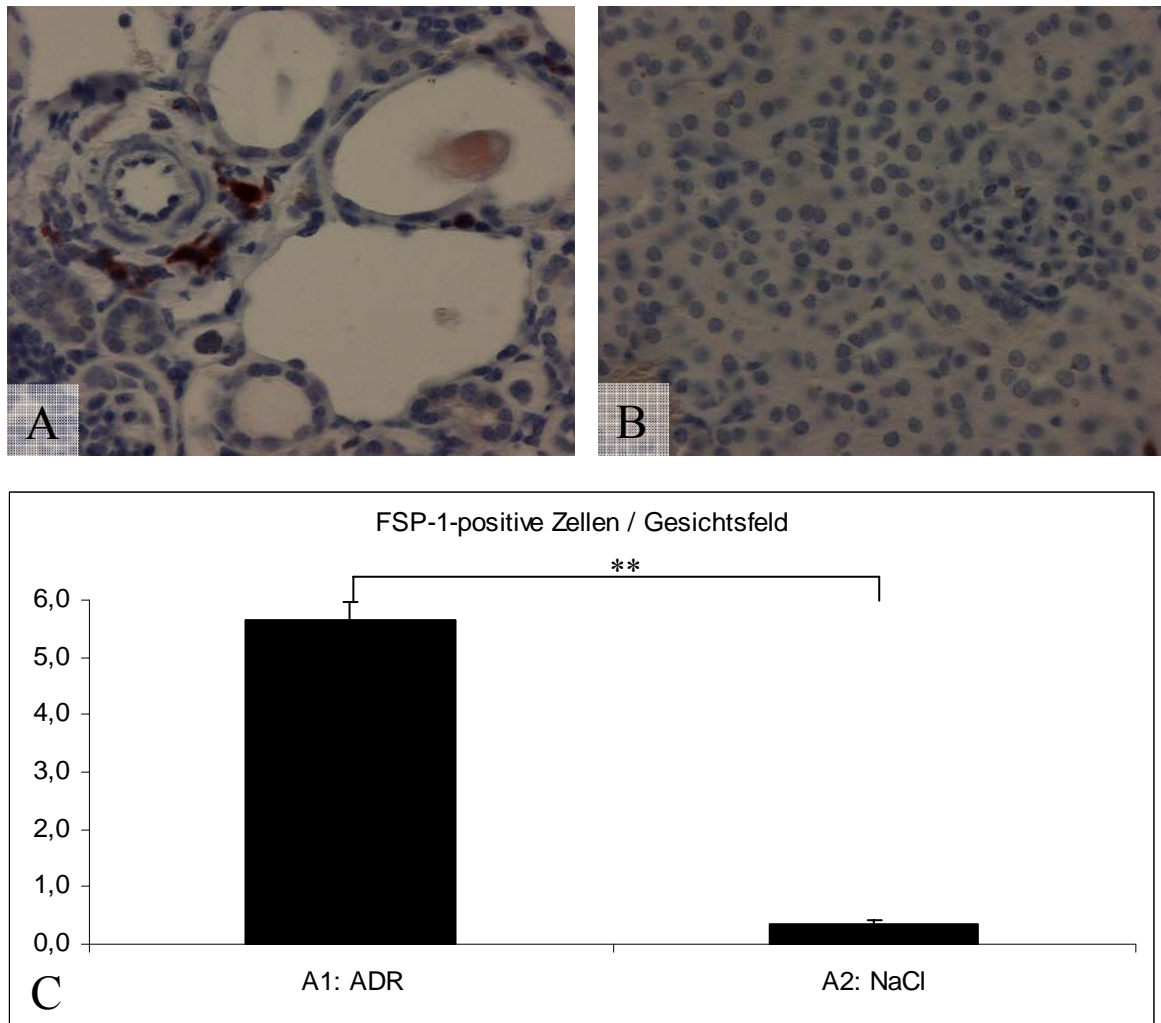


Abbildung 14: Immunhistologie FSP-1-positiver Zellen ADR-behandelter Tiere (A) und der Kontrollgruppe (B). Diagramm (C) zeigt die Zahl FSP-1-positiver Zellen pro Gesichtsfeld in zufällig ausgewählten interstitiellen Läsionen. ** $p < 0,01$

4.1.2 ADR induziert die Expression renaler Chemokine und Chemokinrezeptoren

Es wurden verschiedene Methoden zur Quantifizierung und Lokalisationsdiagnostik von Chemokinen und Chemokinrezeptoren durchgeführt. Mit Hilfe des RNase Protection Assay (RPA) wurde RNA, isoliert aus dem Nierengewebe der untersuchten Mäuse, auf die mRNA-Expression der Chemokine CCL1/TCA-3, CCL2/MCP-1, CCL3/MIP-1 α , CCL4/MIP-1 β , CCL5/RANTES und CCL11/Eotaxin untersucht. Alle diese CC-Chemokine waren bei den ADR-behandelten Tieren stärker exprimiert als bei unbehandelten Kontrolltieren.

Die CCR1-Liganden CCL3/MIP-1 α und CCL5/RANTES waren um das 11,5fache bzw. das 3,5fache erhöht. Tab. 11 zeigt das Verhältnis der Erhöhung aller untersuchten Chemokine bei den ADR-behandelten Tieren im Vergleich zu unbehandelten Tieren.

Tabelle 11: Erhöhung der Chemokin-mRNA der Gruppe A1:ADR (n = 5) im Vergleich zur Kontrollgruppe A2:NaCl (n = 3). Angegeben sind Mittelwert und Standardabweichung des Mittelwertes.

Chemokin	CCL1/ TCA3	CCL2/ MCP-1	CCL3/ MIP-1 α	CCL4/ MIP-1 β	CCL5/ RANTES	CCL11/ Eotaxin
Erhöhung um Faktor	1,3 \pm 0,04	9,0 \pm 4,2	11,5 \pm 6,4	10,8 \pm 5,7	3,5 \pm 1,5	5,6 \pm 2,37

Die in-situ-Hybridisierung wurde mit Riboprobe für CCL2/MCP-1 und CCR5/RANTES durchgeführt und zeigte, wie auch die immunhistologische Untersuchung, eine charakteristische Expression der m-RNA sowie des Proteinproduktes der Chemokine CCL2/MCP-1 und CCL5/RANTES. Wie am Modell der Ureterligatur gezeigt (Vielhauer 2001), konnte CCL2/MCP-1 vor allem im tubulären Bereich nachgewiesen werden, hauptsächlich an Tubulusepithelzellen, in geringerem Ausmaß auch in interstitiellen Zellen. CCL5/RANTES hingegen ließ sich vornehmlich in interstitiellen Infiltraten darstellen, in geringerem Maße auch in Tubulusepithelzellen (Abb. 16). Im Bereich der Glomeruli kam es bei den ADR-behandelten Tieren und den Kontrolltieren nach sechs Wochen zu keinem positiven Signal in in-situ-Hybridisierung und Immunhistologie. Die Negativkontrolle ergab ebenfalls kein Signal im untersuchten Nierengewebe.

Die renale Expression der mRNA für den Chemokinrezeptor CCR1 wurde mit Hilfe der Real-Time-PCR (RT-PCR) evaluiert. Hierbei konnte im Nierengewebe ADR-behandelter Tiere eine 6,7fache Erhöhung der CCR1-mRNA im Vergleich zur Kontrollgruppe beobachtet werden (Abb. 15). Zur Untersuchung der zellspezifischen Expression von CCR1 wurden verschiedene Zellpopulationen isoliert und mittels RT-PCR untersucht, um potentielle Zielzellen für die In-

tervention mit dem CCR1-Antagonisten zu identifizieren. Makrophagen und CD4-positive T-Zellen, isoliert aus der Milz von BALB/c-Mäusen, exprimierten beide CCR1-mRNA. Makrophagen erreichten hierbei einen zehnfach höheren Wert als T-Zellen. Renale Tubuluszellen exprimierten keine mRNA für CCR1, auch nicht nach Stimulation mit Lipopolysaccharid LPS. Auch bei renalen Fibroblasten konnte die fehlende Expression von CCR1 gezeigt werden. Nach Stimulation mit TGF- β kam es ebenfalls zu keiner Expression. Diese Ergebnisse sprechen für die Makrophagen als Hauptquelle der renalen CCR1-Expression beim Modell der ADR-induzierten Nephropathie. Tubuluszellen und Fibroblasten scheinen hingegen nicht zur renalen Expression von CCR1 beizutragen (Tab. 12).

Tabelle 12: Expression des Chemokinrezeptors CCR1 verschiedener Zellpopulationen, gemessen am Quotient CCR1-mRNA / rRNA-mRNA

Zellpopulation	Quotient CCR1-mRNA / rRNA-mRNA $\times 10^{-6}$
F4/80-positive Makrophagen	88
CD4-positive T-Zellen	8,9
Tubulusepithelzellen	0,049
Tubulusepithelzellen (LPS-stimuliert)	0
Fibroblasten	0,66
Fibroblasten (TGF β -stimuliert)	0

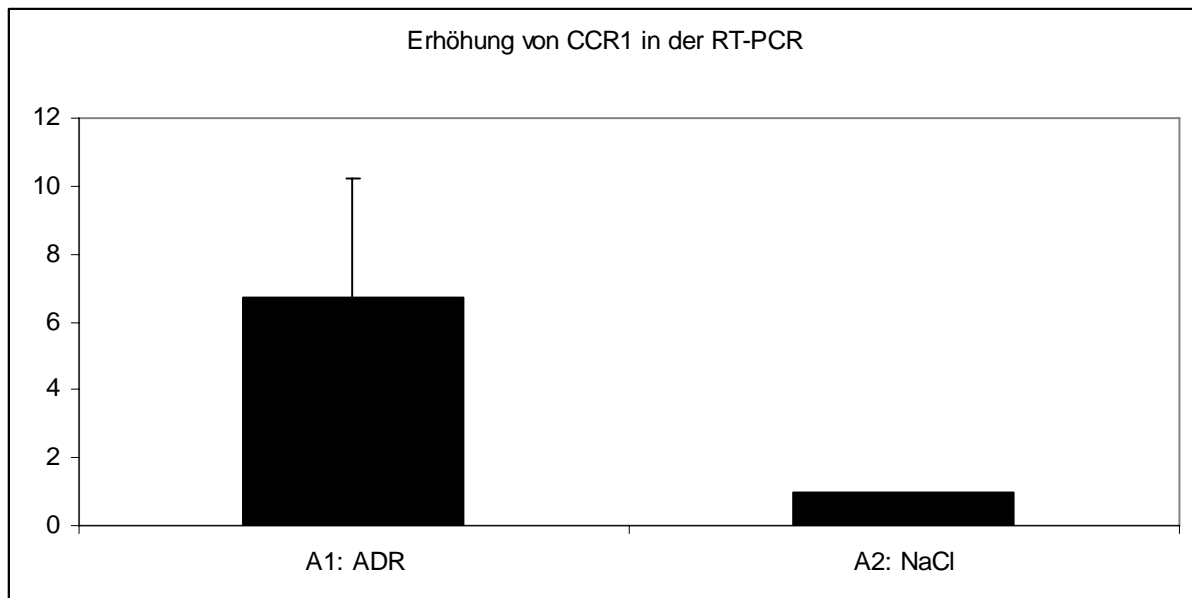


Abbildung 15: Erhöhung des Chemokinrezeptors CCR1 in der Real-time-PCR, Woche 6. Gegenüber der Kontrollgruppe A2: NaCl besteht eine Steigerung um das 6,7fache.

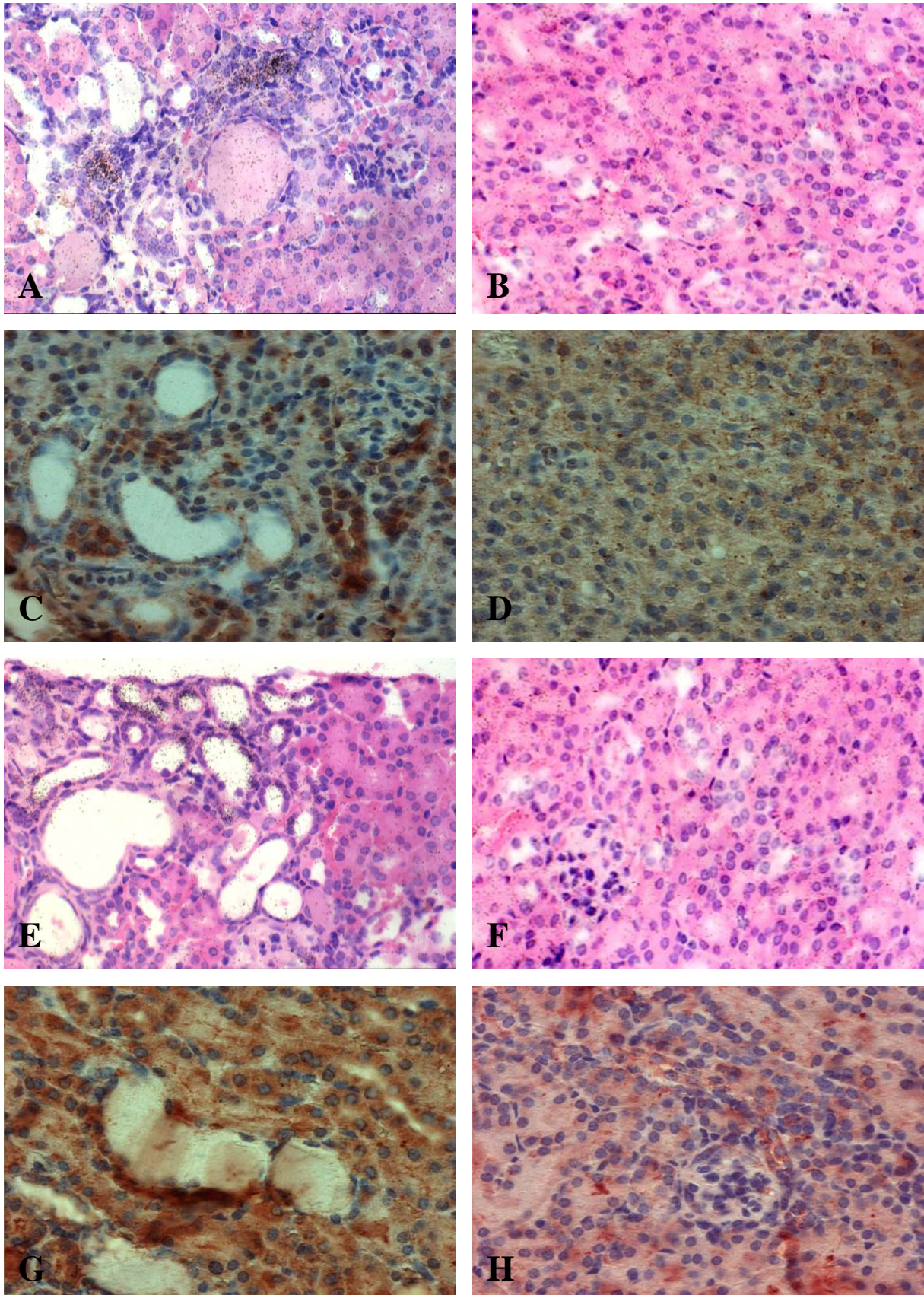


Abbildung 16: In-situ-Hybridisation (A) und Immunhistologie (C) für Chemokin CCL5/RANTES, (B) und (D) zeigen die Tiere der Kontrollgruppe. In-situ-Hybridisation (E) und Immunhistologie (G) für Chemokin CCL2/MCP-1, (F) und (H) zeigen die Tiere der Kontrollgruppe.

4.2 Ergebnisse der Interventionsstudie mit BX471

4.2.1 BX471 hat keinen Einfluss auf die Proteinurie, glomeruläre Schädigung und die funktionellen Parameter der Nierenfunktion

In der Interventionsstudie mit dem CCR1-Antagonist BX471 wurde, wie auch im Charakterisierungsteil, die Veränderung funktioneller Nierenparameter untersucht. In allen ADR-behandelten Tiergruppen (ADR, ADR+Vehikel, ADR+BX471) trat ein Gewichtsverlust auf, jedoch ohne signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen (Abb. 17). Zwischen ADR-behandelten und unbehandelten Tieren kam es zu signifikanten Unterschieden der Parameter Urinalbumin/Urinkreatinin, Serumalbumin, Serumprotein und Serumcholesterin (Tab. 13): ADR-behandelte Tiere entwickelten eine anhaltende Albuminurie mit Ausbildung eines nephrotischen Syndroms. Allerdings konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden zwischen den ADR-behandelten Gruppen, die den Antagonisten erhalten hatten und den Kontrolltieren mit Injektion der Trägerlösung Cyclodextrin (Tab. 13, Abb. 19 und Abb. 21). Auch im zeitlichen Verlauf kam es zu keiner unterschiedlichen Charakteristik des Quotienten Urinalbumin/Urinkreatinin (Abb. 18). Ähnlich verhielten sich die Werte von Serumprotein, Serumalbumin und Serumcholesterin (Abb. 21). Der Retentionsparameter Harnstoff zeigte im Serum ebenfalls keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen (Tab. 13, Abb. 20).

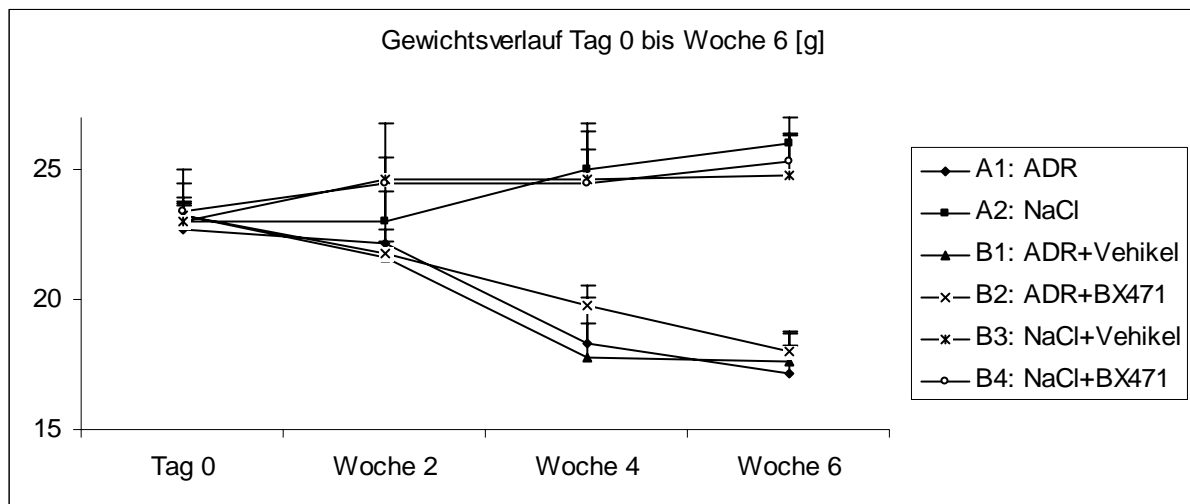


Abbildung 17: Gewichtsverlauf aller Gruppen. Bei allen mit ADR behandelten Tieren kommt es zum Gewichtsverlust. Zwischen den einzelnen ADR-Gruppen sind keine signifikanten Unterschiede festzustellen.

Tabelle 13: Funktionelle und histologische Parameter der Interventionsstudie.

Parameter, Woche 6	B1: ADR + BX471 (n = 5)	B2: ADR + Cyclodextrin (n = 5)	B3: NaCl + Cyclodextrin (n = 5)	B4: NaCl + Bx471 (n = 4)
Urinalbumin/Urinkreatinin [µg/mg]	28005 ± 6928 ^{c,e}	34087 ± 24547 ^{d,f}	65 ± 74	62 ± 62
Serumalbumin [g/dl]	2,0 ± 0,2 ^d	2,0 ± 0,4 ^d	2,7 ± 0,4	2,4 ± 0,4
Serumprotein [g/dl]	4,4 ± 0,2 ^{d,f}	4,5 ± 0,3 ^{d,f}	5,1 ± 0,1	5,0 ± 0,1
Serumcholesterin [mg/dl]	244,7 ± 63,4	263,2 ± 114,2 ^{d,f}	98,8 ± 14,9	86,0 ± 4,3
Serumharnstoff [mg/dl]	24,0 ± 4,4	33,6 ± 20,5	30,4 ± 6,1	23,5 ± 6,1
PAS-positives Areal [% glomerulärer Fläche]	44,3 ± 2,9 ^{c,e}	43,3 ± 1,8 ^{c,e}	18,2 ± 1,9	16,1 ± 1,0
Interstitielles Volumen [%]	17,6 ± 1,6 ^{b,c,e}	13,6 ± 2,7 ^{d,e}	5,5 ± 0,5	4,5 ± 0,4
CD45-positive Zel- len/Gesichtsfeld	7,3 ± 0,2 ^{a,c,e}	4,6 ± 0,4 ^{c,e}	0,3 ± 0,1	0,3 ± 0,1
CD3-positive Zel- len/Gesichtsfeld	3,2 ± 0,6 ^{b,c}	2,5 ± 0,1	0,3 ± 0,1	0,3 ± 0,1
ER-HR3-positive Zel- len/Gesichtsfeld	5,6 ± 0,2 ^{a,c,e}	2,7 ± 0,2 ^{c,e}	0,2 ± 0,04	0,3 ± 0,03
FSP-1-positive Zel- len/Gesichtsfeld	5,4 ± 0,2 ^{a,c,e}	2,7 ± 0,2 ^{c,e}	0,3 ± 0,1	0,3 ± 0,1

Signifikanzniveaus: a) $p < 0,01$ versus B2; b) $p < 0,05$ versus B2; c) $p < 0,01$ versus B3; d) $p < 0,05$ versus B3; e) $p < 0,01$ versus B4; f) $p < 0,05$ versus B4

Bei den Tieren der Kontrollgruppen B3 und B4, die ohne vorherige Injektion von ADR mit BX471 bzw. Cyclodextrin behandelt wurden, kam es zu keiner signifikanten Veränderung der funktionellen Nierenparameter (Tab. 13).

Die Auswertung der konventionellen Lichtmikroskopie nach sechs Wochen zeigte bei den Gruppen B1 und B2 analog zur Gruppe A1 eine fokal-segmentale Glomerulosklerose mit segmentaler Vermehrung hyaliner Matrix, verbunden mit einem Kollabieren der ortständigen Kapillarschlingen in kortikalen Glomeruli.

Die morphometrische Quantifizierung glomerulärer PAS-positiver Ablagerungen zeigte eine Vermehrung PAS-positiven Materials in ADR-behandelten Tieren (Gruppe B1, B2) im Unterschied zu den unbehandelten Tieren (Gruppen B3, B4). Zwischen den Gruppen B1 und B2 bestand kein Unterschied in der glomerulären Pathologie (Tab. 13, Abb. 22).

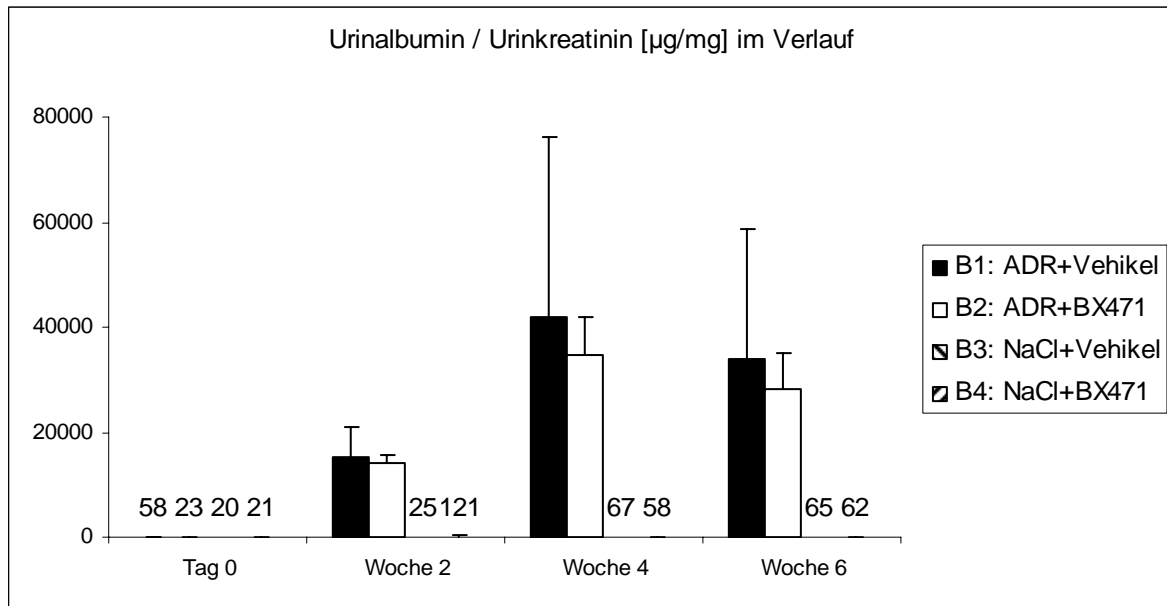


Abbildung 18: Verlauf des Quotienten Urinalbumin / Urinkreatinin in der Interventionsstudie

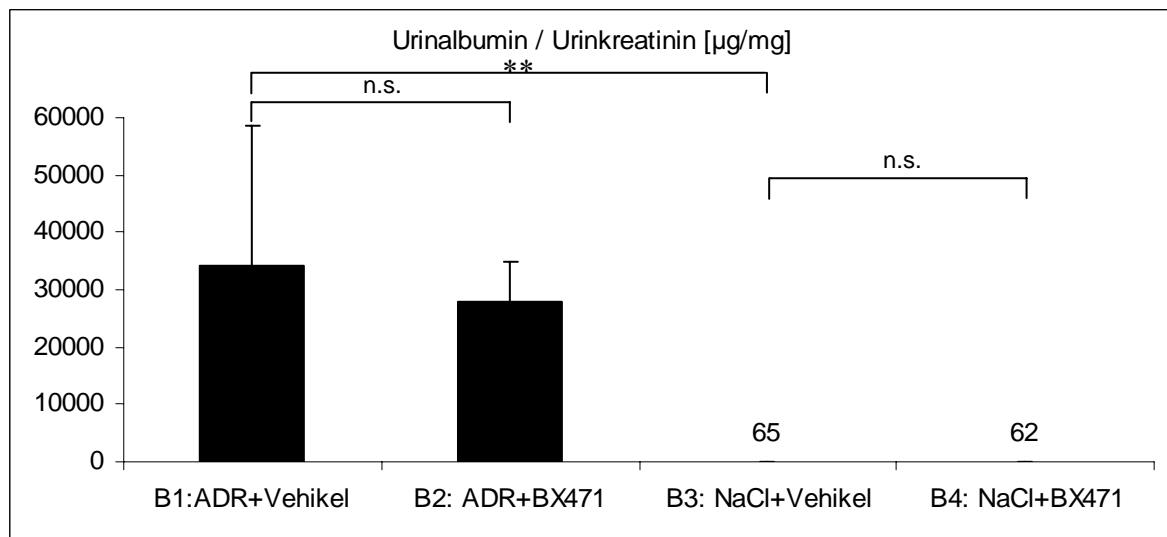


Abbildung 19: Quotient Urinalbumin / Urinkreatinin der Gruppen der Interventionsstudie, Woche 6. Die Gruppen B1 und B2 sowie B3 und B4 zeigen keine signifikanten Unterschiede. ** $p < 0,01$; n.s.: nicht signifikant

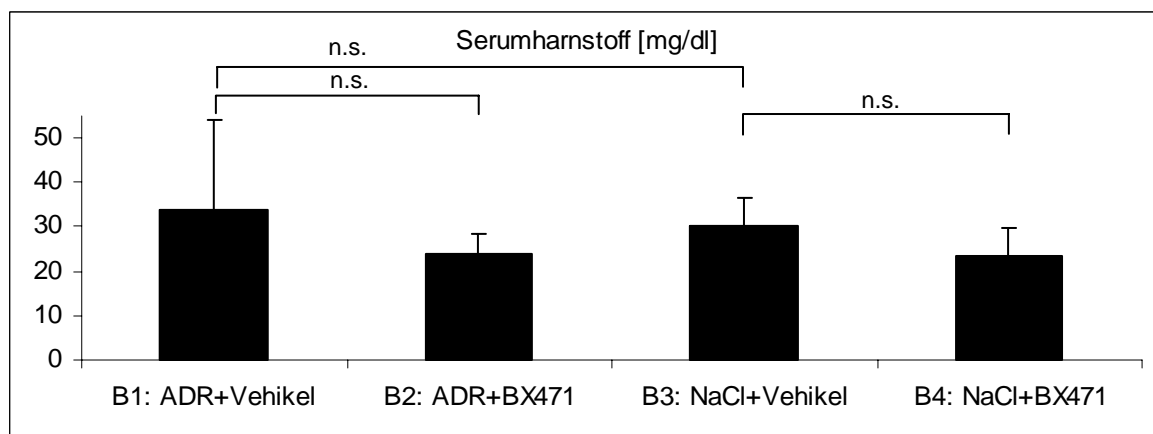


Abbildung 20: Serumharnstoffwerte in der Interventionsstudie. Zwischen BX471-behandelten Tieren und unbehandelten Tieren besteht kein signifikanter Unterschied. n.s.: nicht signifikant

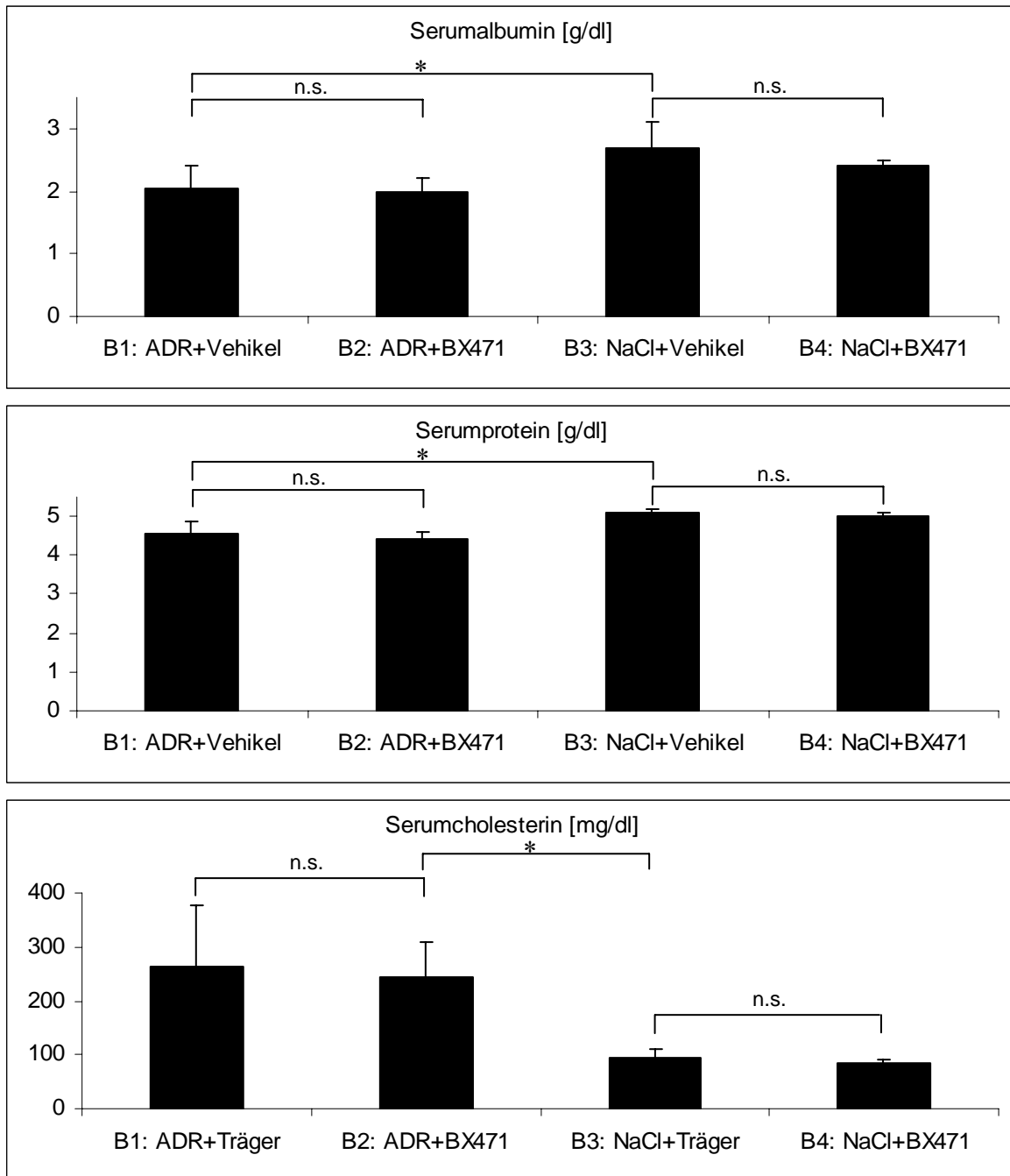


Abbildung 21: Serumwerte in der Interventionsstudie. Die Gruppen B1 und B2 sowie B3 und B4 unterscheiden sich untereinander in keinem der Parameter signifikant. * $p < 0,05$; n.s.: nicht signifikant

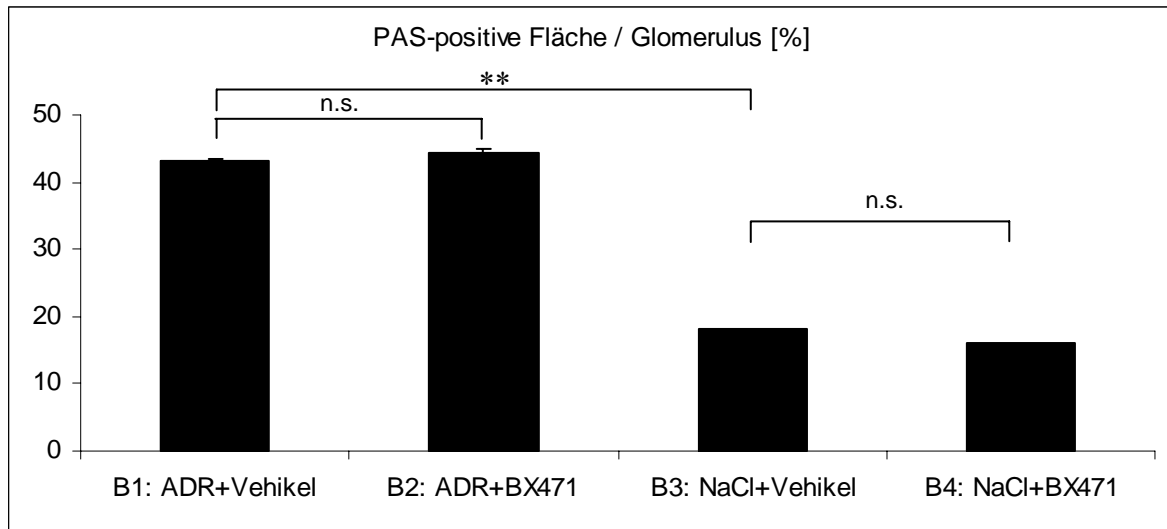


Abbildung 22: Anteil glomerulären PAS-positiven Materials der Gruppen der Interventionsstudie. Die Gruppen B1 und B2 sowie B3 und B4 unterscheiden sich untereinander nicht signifikant. ** $p < 0,01$; n.s.: nicht signifikant

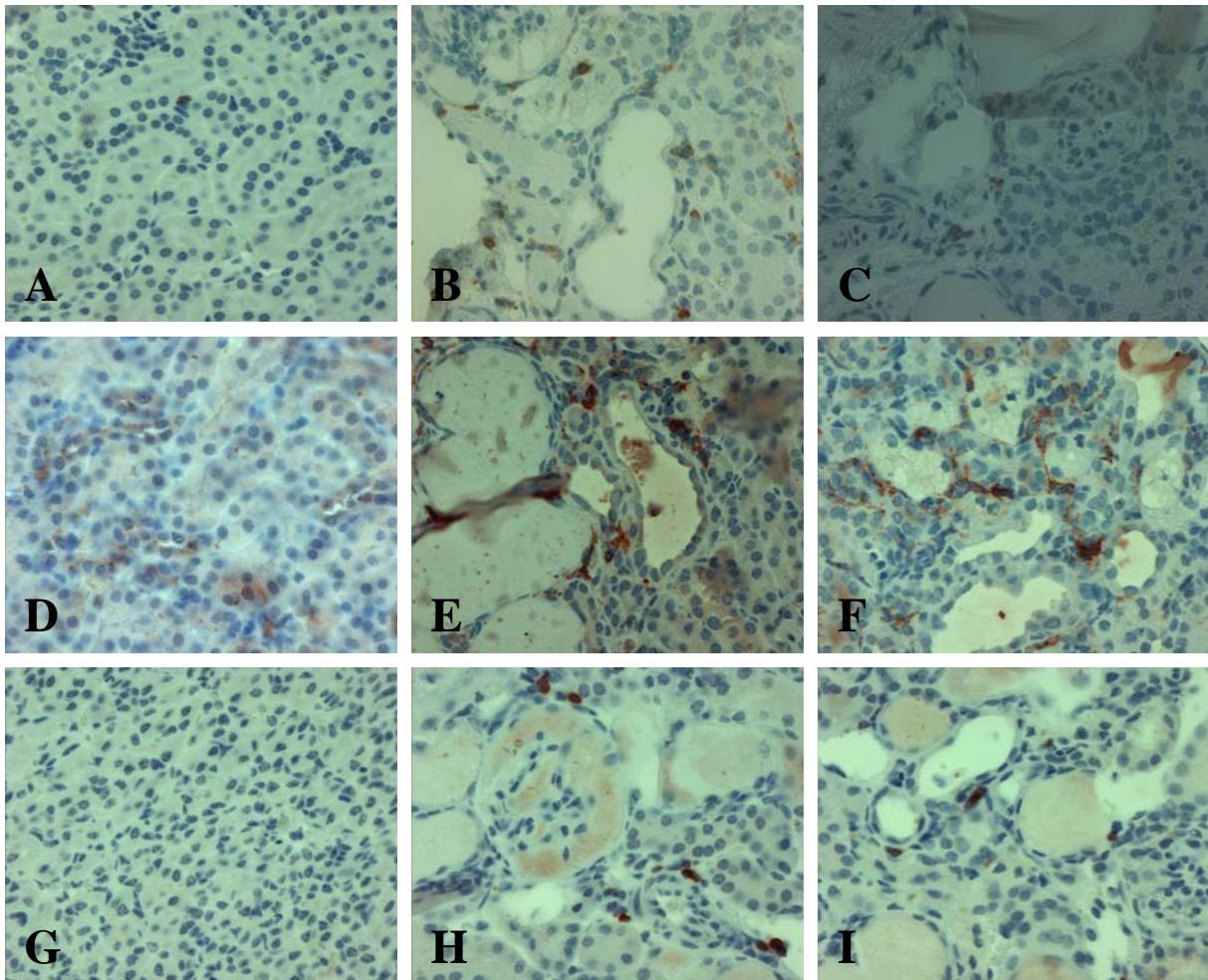


Abbildung 23: Immunhistologie der Zellmarker CD45, ER-HR3 und CD3. CD45 bei Tieren der Gruppe A2: NaCl (A), B1: ADR + Vehikel (B) und B2: ADR + BX471 (C). ER-HR3 bei Tieren der Gruppe A2: NaCl (D), B1: ADR + Vehikel (E) und B2: ADR + BX471 (F). CD3 bei Tieren der Gruppe A2: NaCl (G), B1: ADR + Vehikel (H) und B2: ADR + BX471 (I). Bei allen Zellmarkern ist eine Reduktion durch die Intervention mit dem CCR1-Antagonisten BX471 zu sehen.

4.2.1 BX471 reduziert die Akkumulation proinflammatorischer Zellen im Interstitium

Die Anzahl CD45-positiver Leukozyten, CD3-positiver T-Lymphozyten und ER-HR3-positiver Makrophagen wurde in tubulointerstitiellen Läsionen quantifiziert. Für alle drei Zellmarker konnten signifikante Unterschiede zwischen den ADR-behandelten Tieren (Gruppe B1) und den Tieren der Interventionsgruppe ADR + BX471 (Gruppe B2) in der Anzahl signalpositiver Zellen festgestellt werden. Beim Marker CD45, der von den meisten Leukozytensubpopulationen exprimiert wird, kam es zu einer Reduktion der positiv angefärbten Zellen um 36 % ($7,3 \pm 0,6$ vs. $2,5 \pm 0,4$). Die stärkste Signalreduktion fand sich beim Marker ER-HR3, der spezifisch für Makrophagen ist, mit einem Rückgang um 52 % ($5,6 \pm 0,2$ vs. $2,7 \pm 0,2$). Weniger stark reduziert wurden die Zellen, die auf den Marker CD3 für Lymphozyten positiv reagierten. Diese Subpopulation wurde um 24 % ($3,2 \pm 0,6$ vs. $2,5 \pm 0,1$) verringert (Abb. 23 und 24, Tab. 13).

4.2.2 BX471 reduziert die interstitielle Fibrose und die Anzahl interstitieller Fibroblasten

Das Ausmaß des interstitiellen Volumens wurde an den silbergefärbten Nierenschnitten quantifiziert. Die Behandlung mit BX471 reduzierte den prozentuellen Anteil des interstitiellen Volumens von 17,6 % (ADR + Cyclodextrin) auf 13,6 % (ADR + BX471). Damit ergibt sich in der BX471-behandelten Gruppe eine signifikante Verminderung des interstitiellen Volumens um 23 % (Abb. 25, Tab. 13).

Durch das Anfärben des Zellmarkers FSP-1 wurde die Fibroblastenzahl bestimmt. Durch die Interventionsbehandlung mit BX471 sank die Zahl positiver Zellen in interstitiellen Läsionen signifikant um 49 % ($5,4 \pm 0,2$ vs. $2,7 \pm 0,2$, Abb. 26, Tab. 13).

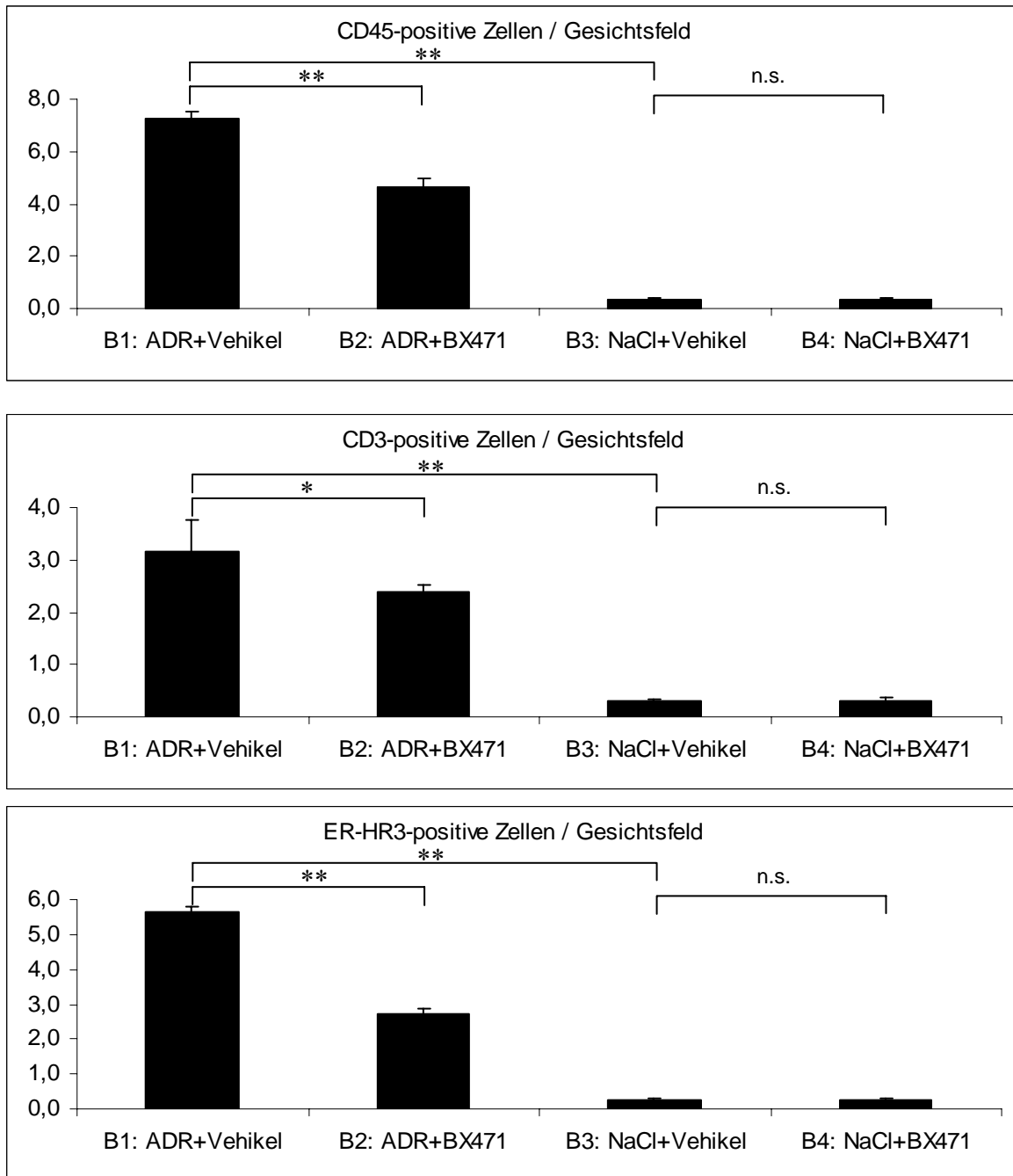


Abbildung 24: Zahl CD45-, CD3- und ER-HR3-positiver Zellen / Gesichtsfeld in der Interventionsstudie. Verringerung durch die Behandlung mit BX471 um % (CD45), % (CD3) bzw. % (ER-HR3). **p < 0,01; *p < 0,05; n.s.: nicht signifikant

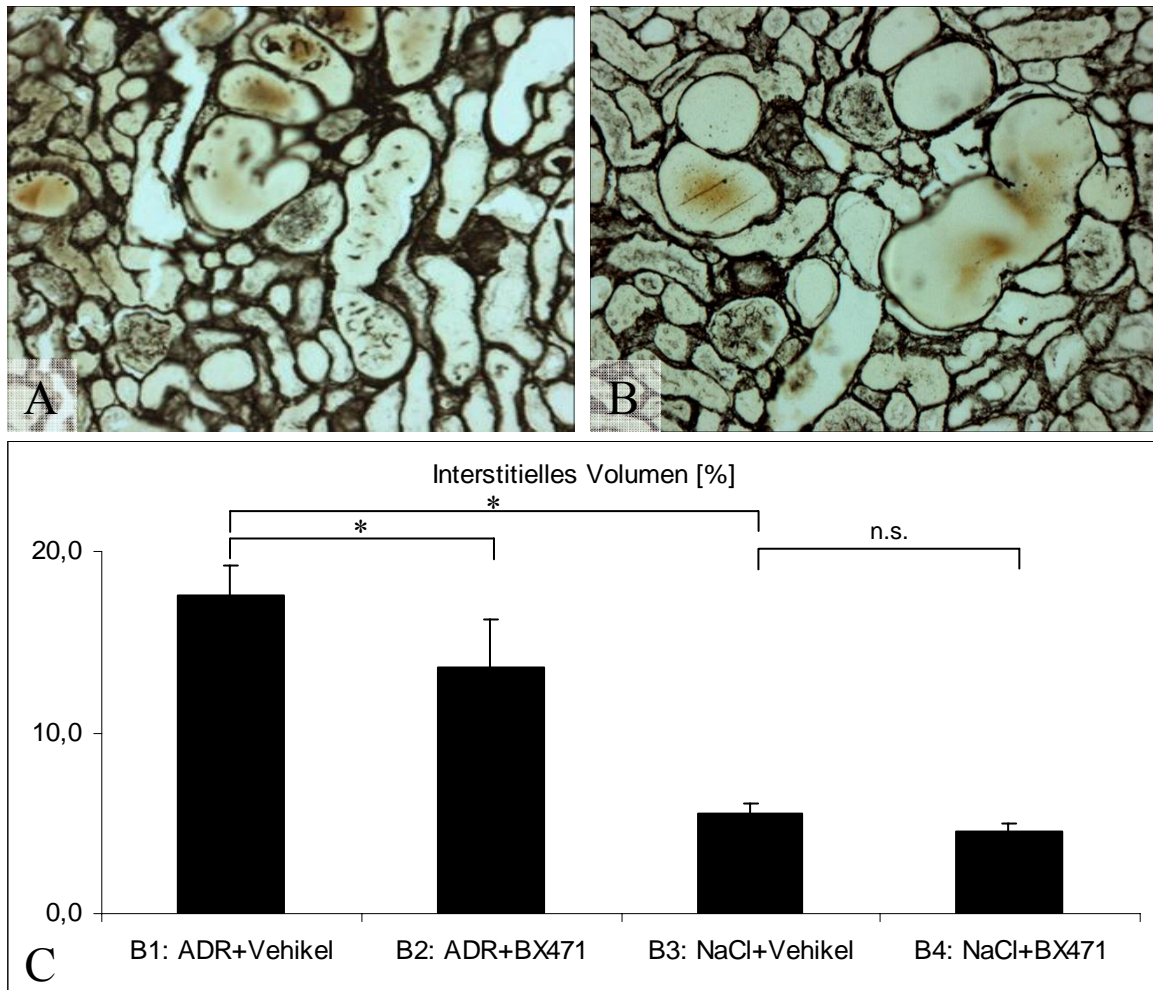


Abbildung 25: Silberfärbung der Gruppen B1: ADR + Cyclodextrin (A) und B2: ADR + BX471 (B). Diagramm (C) zeigt den Anteil interstitiellen Volumens in zufällig gewählten fokalen Läsionen.
 * $p < 0,05$; n.s.: nicht signifikant

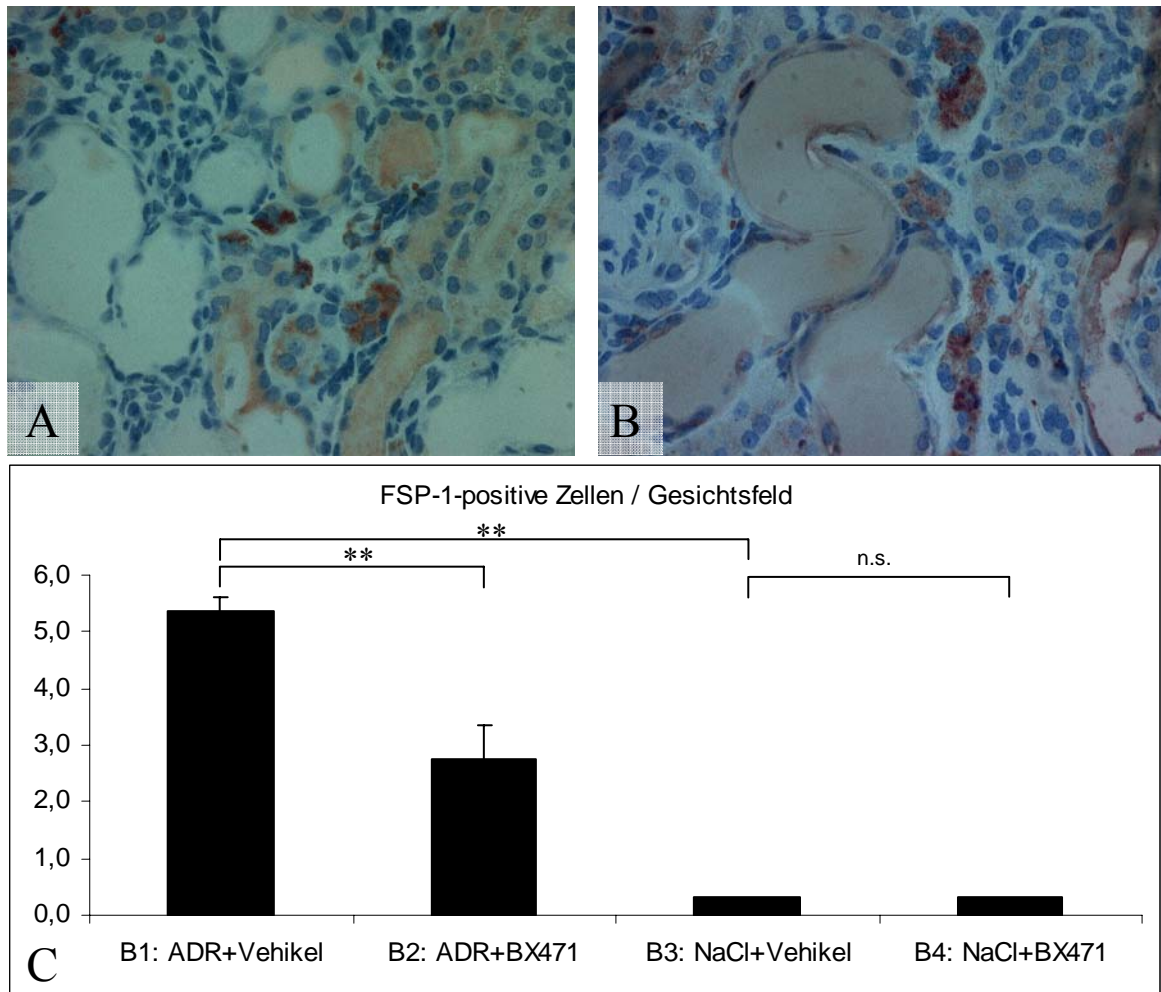


Abbildung 26: Immunhistologie FSP-1-positiver Zellen der Gruppen B1: ADR + Cyclodextrin (A) und B2: ADR + BX471(B). Diagramm (C) zeigt die Zahl FSP-1-positiver Zellen pro Gesichtsfeld in zufällig gewählten fokalen Läsionen. ** $p < 0,01$; n.s.: nicht signifikant

5. Diskussion

5.1 Chemokine und renale Fibrose

Durch chronische Entzündung induzierte Organfibrosen mit progredientem Funktionsverlust sind Herausforderungen, denen die Medizin auch heute noch nicht in ausreichendem Maße gegenüberzutreten kann. In vielen Fällen ist der transplantationsmedizinische Organersatz letztes Mittel, um die Lebensqualität der Patienten in befriedigendem Umfang aufrechterhalten zu können. Bei chronischen Entzündungen der Niere korreliert das Ausmaß der Fibrose eng mit der Infiltration durch Leukozyten (Fogo 2001). Dabei werden die rekrutierten Leukozyten bald zur Hauptquelle inflammatorischer Mediatoren (Risdon 1968). Die infiltrierenden Leukozyten bilden zahlreiche profibrotische Mediatoren, die zum fibrotischen Umbau des Organs beitragen. Chemokine spielen eine wichtige Rolle bei der Rekrutierung dieser inflammatorischen Zellen aus der Blutbahn an ihren Wirkungsort im peripheren Zielorgan. Besonders die inflammatorischen Chemokine der CC-Unterfamilie stellen Mediatoren der selektiven Migration von Leukozyten in entzündetes Gewebe dar. Im Falle von Nierenerkrankungen werden Liganden für die Chemokinrezeptoren CCR1, CCR2 und CCR5 gemeinsam mit diesen Rezeptoren verstärkt renal exprimiert (Pérez de Lema 2001, Vielhauer 2001). Aus diesem Grund bietet sich die Möglichkeit an, die Leukozyteninfiltration und damit die fibrotische Veränderung des Organs durch Eingriff in die Regulationsmechanismen des Chemokin-Chemokinrezeptor-Systems zu vermindern, beispielsweise durch die Blockade des Chemokinrezeptors CCR1 (Anders 2001).

5.2 Die ADR-induzierte Nephropathie als Modell der fokal-segmentalen Glomerulosklerose und chronisch-progredienter Nierenerkrankung

In der vorliegenden Arbeit wurde die ADR-induzierte Nephropathie als Modell einer fokal-segmentalen Glomerulosklerose mit sekundär interstitieller Entzündung und Vernarbung untersucht. Im Jahre 2000 wurde dieses Modell von Wang et al. im BALB/c-Mausstamm charakterisiert. Elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigen die Induktion eines Podozytenschadens durch die Verabreichung von ADR. Die resultierende Proteinurie blieb im gesamten beobachteten Zeitraum (Woche 1 bis 6 nach ADR-Gabe) signifikant erhöht. Infolge der massiven Proteinurie wurde die Infiltration des Tubulointerstitiums durch Makrophagen und T-Lymphozyten nachgewiesen (Wang 2000). Makrophagen exprimieren den Chemokinrezeptor CCR1 und sind wesentliche zelluläre Mediatoren des fibrotischen Gewebeumbaus

(Schlöndorff 1997). In der vorliegenden Arbeit wurde daher die Hypothese untersucht, ob die Administration des CCR1-Antagonisten BX471 die Rekrutierung interstitieller CCR1-positiver Leukozyten, insbesondere Makrophagen, und damit das Ausmaß der interstitiellen Fibrose im Verlauf der ADR-induzierten Nephropathie, vermindert. Bisher noch nicht untersucht war, ob die Administration von BX471 Einfluss auf den primären glomerulären Schaden und Entzündungsverlauf hat.

Eine experimentelle fokale Glomerulosklerose kann sowohl immunologisch als auch nicht immunologisch induziert werden. Als nicht immunologische Methoden wurden z. B. die Verabreichung von Aminonucleosiden (Diamond 1990, Grond 1984), Protein-Overload-Modelle (Eddy 1989, Lulich 1975), die partielle Nephrektomie (Grond 1982, Olson 1982) und das Modell der ADR-induzierten Nephropathie beschrieben. Ein Vorteil des gewählten Modells der ADR-Nephropathie liegt im nichtimmunologischen Charakter der induzierten glomerulären Schädigung. Die toxische Schädigung glomerulärer Podozyten erfolgt bei der ADR-induzierten Nephropathie ohne Beteiligung einer systemischen Immunreaktion. Eine Interventionsbehandlung wie mit dem CCR1-Antagonisten BX471, die lokale, aber auch systemische Immunreaktionen verändern kann, sollte daher die primären glomerulären Schädigungsmechanismen nicht beeinflussen.

Der chronische Charakter des Modells ermöglicht die Untersuchung einer progredienten Nierenschädigung mit chronischer Infiltration von inflammatorischen Zellen und der daraus resultierenden interstitiellen Fibrose. Unter diesen Gesichtspunkten erschien das Modell der ADR-induzierten Nephropathie geeignet, um Effekte des CCR1-Antagonisten BX471 auf den Verlauf der primären glomerulären Entzündung mit sekundärer interstitieller Nephritis und Fibrose zu untersuchen.

Von besonderer Bedeutung für einen potentiellen therapeutischen Einsatz am Menschen ist die Tatsache, dass die ADR-induzierte Nephropathie im Verlauf glomerulärer und interstitieller Veränderungen den Verlauf chronischer proteinurischer Nierenerkrankungen beim Menschen widerspiegelt (Wang 2000).

5.3 Die Administration von ADR induziert eine fokal-segmentale Glomerulosklerose mit interstitieller Chemokinexpression und Leukozyteninfiltration

Die lichtmikroskopische Untersuchung von Nierengewebe ADR-behandelter Tiere zeigte in den durchgeführten Experimenten die in den Vorarbeiten beschriebenen charakteristischen Zeichen einer fokal-segmentalen Glomerulosklerose. Durch die Behandlung kam es zur segmentalen Vermehrung hyaliner Matrix und zum Kollabieren von Kapillarschlingen betroffener Glomeruli. Weiterhin konnten dilatierte und strukturell geschädigte Tubuli und eine Expansion des Interstitiums gesehen werden. Elektronenmikroskopisch konnte nach Administration von ADR die Induktion eines Podozytenschadens gezeigt werden, der konsekutiv zu ausgeprägter Albuminurie führte. Dieser Schaden beruht vermutlich auf einem direkten zytotoxischen Effekt von ADR; die Akkumulation der Substanz scheint keine Rolle zu spielen, da ADR schnell aus Blut und Nierengewebe eliminiert wird (Ohtake 1997, Tavoloni 1980). Es wurde ein Krankheitsbild erzeugt, dass durch ein nephrotisches Syndrom mit massiver Albuminurie, Hypoproteinämie, Hypoalbuminämie und Hypercholesterinämie charakterisiert war. Histologisch zeigte sich eine fokal-segmentale Glomerulosklerose, Tubulusschädigung und Vermehrung des interstitiellen Volumens durch extrazelluläre Matrix sowie leukozytärem Infiltrat. Der Grund der im Vergleich zu Vorversuchen (Wang 2000) benötigten höheren Dosis von ADR liegt möglicherweise in einer genetischen Variabilität zwischen den BALB/c-Mauslinien verschiedener Züchter. Die zweizeitige Gabe von ADR erwies sich als vorteilhaft, da bei dieser Applikationsweise eine konstante und anhaltende Albuminurie induziert werden konnte. Die glomeruläre und interstitielle Schädigung bildete sich mit geringerer Variabilität als bei einzeltiger Applikation von ADR aus.

Trotz der ausgeprägten interstitiellen Läsionen kam es zu keinem signifikanten Anstieg der Retentionsparameter (Serumkreatinin) in den ADR-behandelten Tieren. Dies liegt vermutlich am fokalen Charakter des Modells und der begrenzten Anzahl verwendeter Tiere. Allerdings konnte eine Tendenz zu erhöhten Serumkreatinin-Werten in den ADR-injizierten Tieren nachgewiesen werden ($p = 0,077$).

In der Quantifizierung im RNase Protection Assay zeigte sich eine erhöhte renale Expression der proinflammatorischen Chemokine CCL1-5 und CCL11/Eotaxin. CCL3/MIP-1 α und CCL5/RANTES sind bekannte Liganden des Chemokinrezeptors CCR1. In in-situ-Hybridisierung und Immunhistologie zeigte sich, dass in den Nieren der ADR-behandelten Tiere die Chemokine CCL2/MCP-1 und CCL5/RANTES im Tubulointerstitium exprimiert werden. Ein ähnliches Expressionsmuster wurde bereits in anderen Modellen, wie der obstruktiven Nephro-

pathie und der Lupusnephritis nachgewiesen (Vielhauer 2001, Pérez de Lema 2001). Auch in den ADR-behandelten Tieren wurden CCL2/MCP-1 hauptsächlich in Tubulusepithelien nachgewiesen, während der CCR1-Ligand CCL5/RANTES vornehmlich im interstitiellen Zellinfiltrat, jedoch auch in Tubuluszellen exprimiert wurde. Eine glomeruläre Expression der untersuchten Chemokine wurde nicht festgestellt.

Der CCL3/MIP-1 α - und CCL5/RANTES-Rezeptor CCR1 wurde in den Nieren der ADR-behandelten Tiere ebenfalls verstärkt exprimiert. CCR1 vermittelt die Bindung von Leukozyten an endothelgebundene Chemokine und dadurch die Aktivierung von β 2-Integrinen, die in der Phase des „rolling“ für die feste Adhäsion der Leukozyten unerlässlich sind (Springer 1995). Die Blockade von CCR1 erwies sich als erfolgreich in Versuchen, durch pharmakologische Maßnahmen die Adhäsion und Transmigration von Leukozyten durch Endothelien zu verhindern (Weber 2001). Bisher gibt es keinen Anhalt für die Expression der Chemokinrezeptoren CCR1, CCR2 und CCR5 durch intrinsische Nierenzellen. Auch in der vorliegenden Arbeit konnte keine CCR1-Expression durch unstimulierte oder stimulierte Tubuluszellen und renale Fibroblasten nachgewiesen werden. Hingegen konnte in der vorliegenden Arbeit die CCR1-Expression durch Makrophagen und CD4-positive T-Zellen in der real-time-PCR gezeigt werden. Renale Fibroblasten produzieren nach Stimulation durch aktivierte Makrophagen Matrixkomponenten wie Kollagen I (Gharaee-Kermani 1996). Dies legt nahe, dass Chemokine direkt durch intrinsische Nierenzellen oder von infiltrierenden Makrophagen sezerniert durch Rekrutierung leukozytärer Effektorzellen zur interstitiellen Fibrose beitragen. Für die wichtige Rolle des leukozytären Infiltrates spricht auch, dass unter anderem am Modell der MRL-Fas^{lpr}-Lupusnephritis (Hasegawa 2003, Perez de Lema 2001) und der Apoferritin-induzierten Glomerulonephritis (Anders 2003) beobachtet wurde, dass die Sekretion von Chemokinen in der Niere der Immigration von Leukozyten und der Sekretion renaler Zytokine vorausgeht. Der Eingriff in das Chemokin-Chemokinrezeptor-System erweist sich also als vielversprechender Ansatz, um verschiedene Faktoren, die zur progressiven Niereninsuffizienz führen können, zu untersuchen. Unter diesen Voraussetzungen erwies sich das Modell der ADR-induzierten Nephropathie als geeignet für eine Interventionsstudie mit dem CCR1-Antagonisten BX471.

5.4 Die pharmakologische Blockade von CCR1 hat keinen Einfluß auf glomerulären Schaden und Albuminurie

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sprechen gegen einen Einfluß der pharmakologischen Blockade von CCR1 auf das Ausmaß der glomerulären Schädigung. Funktionelle Parameter wie Albuminurie, Serumprotein, -albumin und -cholesterol sowie das Ausmaß der Glomerulosklerose als histologischer Parameter wurden durch die Behandlung mit BX471 nicht signifikant verändert. Für den in elektronenmikroskopischen Untersuchungen beobachteten Podozytenschaden ist das direkt zytotoxische Potential von ADR verantwortlich. Der Primärschaden wird dann vermutlich durch einen sich selbst unterhaltenden Prozess verstärkt und resultiert in persistierender Albuminurie. Diese Schädigungsmechanismen sind den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit zufolge unabhängig von dem Chemokinrezeptor CCR1, da die pharmakologische Rezeptorblockade keinen positiven Effekt auf glomeruläre Läsionen und Albuminurie zeigen konnte. Zu dieser Vermutung passt die Beobachtung, dass bei Versuchsende nach Woche 6 in immunhistologischen Experimenten keine glomeruläre Infiltration durch CD45-positive Leukozyten beobachtet werden konnte. In früheren Studien wurde zwar eine glomeruläre Infiltration durch Makrophagen im Frühstadium der ADR-induzierten Nephropathie beschrieben, diese war jedoch zu späteren Versuchszeitpunkten rückläufig (Wang 2000). Über eine glomeruläre Infiltration durch T-Zellen wurde bisher nicht berichtet. Darüber hinaus zeigten in-situ-Hybridisierung und Immunhistologie keine glomeruläre Expression oder Produktion der Chemokine CCL2/MCP-1 sowie CCL5/RANTES zum Zeitpunkt der Woche 6. Im tubulointerstitiellen Kompartiment jedoch konnten beide Chemokine beim Versuchsende nachgewiesen werden. Insgesamt lassen diese Beobachtungen darauf schließen, dass der positive Effekt von BX471 auf das interstitielle Gewebekompartiment beschränkt ist, in dem CCR1-Liganden wie CCL5/RANTES exprimiert werden und CCR1-positive Makrophageninfiltrate auftreten.

5.5 Die pharmakologische Blockade des Chemokinrezeptors CCR1 verringert die interstitielle Akkumulation von Leukozyten

Makrophagen exprimieren CCR1 deutlich stärker als T-Zellen, wie die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimente mit einzelnen Leukozytensubpopulationen zeigten. Vermutlich aufgrund dieser Tatsache war die Reduktion ER-HR3-positiver Makrophagen durch pharmakologische Blockade des Rezeptors mittels BX471 am stärksten ausgeprägt; der prozentual geringere Abfall von CD3-positiven T-Zellen durch die Behandlung

ist konsistent mit der durch RT-PCR erhobenen geringeren Expression von CCR1-mRNA isolierter T-Zellen. Neben einem direkten CCR1-Antagonismus könnte ein weiterer Grund für die verringerte Akkumulation von T-Zellen auch die erniedrigte Ausschüttung chemotaktischer Faktoren durch die verringerte Makrophagenpopulation in der Niere sein.

Tokuda et al. untersuchten die Bedeutung der CCR1-Blockade für fibrotische Modelle an einem Modell Bleomycin-induzierter pulmonaler Fibrose. Sie konnten an diesem in-vivo-Experiment demonstrieren, dass die Blockade von CCR1, nicht aber von CCR2, mittels neutralisierender Antikörper zur Reduktion infiltrierender Makrophagen führte (Tokuda 2000). Am Modell der obstruktiven Nephropathie nach unilateraler Ureterligatur konnte durch die Behandlung mit dem CCR1-Antagonisten BX471 eine ähnliche Reduktion der Akkumulation von Leukozyten im interstitiellen Kompartiment aufgezeigt werden (Anders 2002). Ziel der vorliegenden Arbeit war auch, diese Beobachtungen an einem Modell einer progredienten Nierenerkrankung infolge einer primären glomerulären Schädigung zu bestätigen. Sowohl CCR1 als auch seine Liganden CCL3/MIP-1 α und CCL5/RANTES waren bei der ADR-induzierten Nephropathie verstärkt exprimiert. Die immunhistologische Auswertung des Experiments zeigte eine verminderte Akkumulation interstitieller Leukozyten nach Administration von BX471. Diese Beobachtungen korrelieren mit ähnlichen Effekten von CCR1-Antagonisten in anderen Modellen wie der Transplantation von Nieren (Horuk/Shurey 2001) und Herz (Horuk/Clayberger 2001) und der experimentellen Enzephalomyelitis (EEA, Eltayeb 2003). Diese Daten sprechen insgesamt für eine entscheidende Rolle des Chemokinrezeptors CCR1 bei der Rekrutierung von Leukozyten, insbesondere von Makrophagen, in entzündetes Gewebe.

5.6 BX471 reduziert die renale Fibrose

Im vorliegenden Experiment war die Reduktion der renalen Infiltration interstitieller Makrophagen und T-Zellen verbunden mit einem Rückgang des interstitiellen Volumens sowie der FSP-1-positiven Fibroblasten. Beide Parameter wurden durch die Behandlung mit dem CCR1-Antagonisten BX471 signifikant verringert. Grundsätzlich werden in der Literatur drei zelluläre Mediatoren für die Proliferation von Fibroblasten und die Bildung interstitieller Matrix diskutiert: aktivierte Tubuluszellen, infiltrierende Leukozyten und interstitielle Zellen durch parakrine Stimulation und direkte Zell-Zell-Kontakte (Zeisberg 2000). Neue Untersuchungen haben gezeigt, dass auch Mastzellen zu den Promotoren renaler interstitieller Fibrose zählen (Kondo 2001).

Bei dem Modell der ADR-induzierten Nephropathie wurde trotz der Intervention mit BX471 aufgrund des fehlenden Effekts auf die glomeruläre Pathologie eine persistente Albuminurie festgestellt, die einen permanenten Stimulus für die Aktivierung von Tubuluszellen und die Ausschüttung von Chemokinen darstellt (Abbate 1998). Dies ist insofern von Interesse, als bei RT-PCR-Experimenten keine Expression von CCR1-mRNA auf Tubuluszellen festgestellt werden konnte. Die Verminderung der Fibrose scheint daher nicht auf einen direkten Effekt einer BX471 vermittelten Blockade von CCR1 auf Tubuluszellen im Rahmen der tubulopithelialen Aktivierung von Myelofibroblasten oder der epithelial-mesenchymalen Transformation zurückzuführen zu sein. Auch ein direkter Effekt des CCR1-Antagonisten auf renale Fibroblasten ist unwahrscheinlich, da auch diese Nierenzellpopulation keine Expression von CCR1 zeigte, im Gegensatz zur beschriebenen Expression von anderen Chemokinrezeptoren wie CCR2 in renalen und extrarenalen Fibroblasten (Yamamoto 2003).

Die Ergebnisse der vorgelegten Arbeit zeigen, dass eine persistierende Albuminurie als alleiniger Stimulus für die renale Fibrosierung offenbar nicht ausreicht. Trotz unveränderter Albuminurie kam es bei den BX471-behandelten Tieren zu einem Rückgang interstitiellen Volumens und FSP-1-positiver Fibroblasten. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die durch die Behandlung mit BX471 reduzierte Leukozyteninfiltration einen entscheidenden Stimulus für Proliferation und Aktivierung von Fibroblasten darstellt. Insbesondere Makrophagen sezernieren eine Vielzahl an aktivierenden profibrotischen Mediatoren, darunter TGF- β , Platelet-derived Growth Factor, Basic Fibroblast Growth Factor, Connective Tissue Growth Factor, und Platelet Activating Factor (Diamond 1998, Zeisberg 2000). Insbesondere die drei Isoformen von TGF- β werden als entscheidende Faktoren im Fibrosierungsprozess angesehen (Yu 2003). Der Zusammenhang zwischen der Infiltration durch mononukleäre Leukozyten und der Vermehrung interstitiellen Volumens wurde auch am Modell der unilateralen Ureterobstruktion gezeigt, bei dem eine Intervention durch die Verabreichung von BX471 neben einem verminderten Leukozyteninfiltrat ebenfalls zu einer Reduktion von Parametern der interstitiellen Fibrose führte (Anders 2002).

Diese Ergebnisse lassen sich auch an extrarenalen Modellen bestätigen. Die Untersuchungen am oben genannten Modell der Bleomycin-induzierten Lungenfibrose zeigen, dass der Chemokinrezeptor CCR1 auch bei diesem Fibrosemodell einen potentiellen Angriffspunkt zur Verminderung der Aktivierung von Fibroblasten und der Ablagerung extrazellulärer Matrix darstellt (Tokuda 2000). Sowohl im Modell der Lungenfibrose als auch in der vorliegenden Arbeit konnte durch die Blockade von CCR1 die Fibrose trotz Fortbestehen des profibrotischen Stimulus vermindert werden. Damit liegt nahe, dass leukozytärer, am ehesten durch

Makrophagen exprimierter CCR1 und seine Liganden im Allgemeinen durch Rekrutierung leukozytärer Effektorzellen eine wichtige Rolle in Fibrosierungsprozessen einnehmen.

Neben ortsständigen Fibroblasten spielen auch Myofibroblasten eine Rolle, die sich durch den Prozess der epitheliomesenchymalen Transformation (EMT) aus Tubulusepithelzellen entwickeln. Auch an dieser Differenzierung sind Makrophagen durch die Stimulation dieser Tubulusepithelzellen mit dem profibrotischen Zytokin FGF-2 beteiligt (Strutz 2002). Außerdem wandern aus dem Knochenmark fibroblastische Vorläuferzellen, die als Fibrozyten bezeichnet werden, in entzündete Gewebe ein und tragen zur lokalen Fibrose bei (Bucala 1994). Ob Fibrozyten CCR1 exprimieren und bei der interstitiellen Nierenfibrose eine pathogenetische Rolle spielen ist bisher noch nicht bekannt.

5.7 Die CCR1-vermittelte Reaktion beschränkt sich auf das interstitielle Kompartiment

Schädigungen des Nierenparenchyms führen zur Sekretion von proinflammatorischen Mediatoren, die zur Infiltration durch Leukozyten führen. Ist der entzündliche Prozess auf Glomerulus oder Tubulointerstitium beschränkt, ist auch die Leukozytenakkumulation auf das entsprechende Kompartiment beschränkt (Anders 2001, Vielhauer 2001). Die vorliegende Arbeit zeigt die Komplexität dieser Rekrutierungsprozesse. Der Ort der primären Schädigung ist bei der ADR-induzierten Nephropathie im Glomerulus lokalisiert. Durch die zelltoxische Wirkung des ADR kommt es zum Podozytenschaden, der eine Albuminurie verursacht. Die chronische Proteinurie führt sekundär zu einem tubulointerstitiellen Schaden mit Akkumulation von Leukozyten im interstitiellen Kompartiment. Während zum Zeitpunkt des Versuchsendes (Woche 6) verschiedene Leukozytensubpopulationen im Tubulointerstitium präsent waren, konnte kein glomeruläres Infiltrat gefunden werden. Im Gegensatz zur interstitiellen konnte zu diesem Zeitpunkt auch keine glomeruläre Chemokinexpression nachgewiesen werden. In anderen Modellen experimenteller Glomerulonephritiden konnte jedoch die Anwesenheit intraglomerulärer Makrophagen wie auch die Präsenz CCR1-stimulierender Chemokine gezeigt werden, zum Beispiel bei der Apoferritin-induzierten Immunkomplexnephritis (Anders 2001). Ob an dieser Immigration der Chemokinrezeptor CCR1 beteiligt ist, ist noch unklar. In der vorliegenden Arbeit kam es durch die Intervention mit dem CCR1-Antagonisten BX471 zu keiner signifikanten Reduktion der Albuminurie. Obwohl die Intervention zeitgleich mit der zweiten Applikation von ADR begann, konnte das Ausmaß der Albuminurie nicht beeinflusst werden. Diese Ergebnisse weisen auf unterschiedliche biologische Mechanismen der glomerulären und interstitiellen Gewebeschädigung und Entzündungsreaktion hin.

5.8 Schlussfolgerung der vorliegenden Arbeit

Die pharmakologische Blockade des Chemokinrezeptors CCR1 mit dem Antagonisten BX471 führte bei der ADR-induzierten Nephropathie zu einer Verminderung der Akkumulation interstitieller Leukozyten, insbesondere wurde die Anzahl interstitieller Makrophagen reduziert. Bei diesem Modell einer chronischen interstitiellen Nierenerkrankung infolge fokal-segmentaler Glomerulosklerose führte diese Leukozytenreduktion zu einer verminderten renalen Fibrosierung. Dieser positive Effekt trat trotz weiterhin unverändert bestehender glomerulären Schädigung mit Albuminurie ein. Diese Beobachtungen sprechen für eine wichtige Rolle des Chemokinrezeptors CCR1 bei der Leukozytenrekrutierung in das geschädigte Nierenparenchym, insbesondere das interstitielle Kompartiment, und der Vermittlung progressiver fibrotischer Prozesse. Die pharmakologische Blockade von CCR1 mit dem Chemokinantagonisten BX471 könnte daher einen vielversprechenden therapeutischen Ansatz in der Behandlung chronisch proteinurischer Nierenerkrankungen darstellen und das Fortschreiten zur terminalen Niereninsuffizienz verzögern.

6. Abstract

Background. Immigration of leukocytes into inflamed tissue is mediated by CC chemokines. Blockade of the CC chemokine receptor CCR1 was shown to reduce interstitial inflammation and fibrosis in murine obstructive nephropathy. However, it is not known whether CCR1 blockade is protective in progressive renal injury associated with severe proteinuria. This study therefore examines the effect of the small-molecule CCR1 antagonist BX471 in a murine model of adriamycin-induced focal segmental glomerulosclerosis (FSGS) with nephrotic syndrome and progressive interstitial inflammation and fibrosis.

Methods. Adriamycin (ADR) nephropathy with persistent proteinuria was induced in male BALB/c mice by two intravenous injections of ADR (13 mg/kg) at day 0 and 14. BX471 treatment was started at day 14 when proteinuria had developed. At 6 weeks, renal histology was studied by morphometry and immunohistochemistry. The expression of chemokines was localised by immunohistochemistry and quantified by RNase protection assays. The expression of CCR1 in different leukocyte subsets was quantified by PCR.

Results. At week 6, ADR-treated mice showed focal segmental glomerular sclerosis, associated with tubulointerstitial injury consisting of tubular dilation and atrophy, interstitial leukocyte infiltration and fibrosis. The mRNA expression of CCR1 and CC chemokines, including the CCR1 ligands CCL3/MIP-1 α and CCL5/RANTES, was upregulated in diseased kidneys, with a prominent interstitial expression of CCL5/RANTES. The major CCR1-expressing cell subset were F4/80-positive macrophages. Compared to vehicle-treated controls BX471 significantly reduced the amount of macrophages and T lymphocytes in interstitial lesions by 51 % and 22 %, respectively. Markers of renal fibrosis such as interstitial fibroblasts (48 %) and interstitial volume (23 %) were significantly reduced by BX471 treatment. In contrast, the extent of proteinuria and glomerular sclerosis was not affected by BX471 treatment.

Conclusion. Blockade of CCR1 substantially reduced interstitial leukocyte accumulation and the subsequent renal fibrosis in a murine model of nephrotic syndrome and FSGS. These findings support a role for CCR1 in interstitial leukocyte recruitment and suggest that CCR1 blockade might be a new therapeutic strategy in progressive nephropathies such as FSGS.

7. Abkürzungen und Begriffe

ABTS	2,2'-azino-di-[3-ethylbenzthiazoline sulfonate (6)] diammonium salt crystals
ACE	Angiotensin converting enzyme
ADR	Adriamycin
AEC	3-Amino-9-ethylcarbazole
APES	3-Aminopropyltriethoxy-silan
BSA	Bovines Serum-Albumin
C3	Komplementfaktor 3
°C	Grad Celsius
CCR	Chemokinrezeptor
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethyldiamintetraacetat
EGF	Epidermal growth factor
ELISA	Enzyme-linked-immunosorbent-assay
ENA-78	Epithelial-neutrophil activating peptide 78
EUR	Euro
FGF	Fibroblast growth factor
FITC	Fluorescein isothiocyanate
FSGS	Fokal-segmentale Glomerulosklerose
FSP-1	Fibroblast specific protein 1
GBM	Glomeruläre Basalmembran
GN	Glomerulonephritis
GS	Glomerulosklerose

HCl	Salzsäure
HHV-8	Humanes Herpesvirus-8
HIV	Human immunodeficiency virus
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxyd
HPF	High power field, Gesichtsfeld
IgA	Immunglobulin A
IgE	Immunglobulin E
IgG	Immunglobulin G
IL-1 β	Interleukin-1 β
IL-8	Interleukin-8
IFN- γ	Interferon- γ
IP-10	Interferon-induced protein-10
KCl	Kaliumchlorid
kDa	10 ³ Dalton
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
l	Liter
LPS	Lipopolisacharid
μ l	Mikroliter
M	Molar
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein-1
MIP-1	Macrophage inflammatory protein-1
ml	Milliliter
NaCl	Natriumchlorid
NF- κ B	Nuclear factor- κ B
Na ₂ EDTA	Dinatrium-Ethyldiamintetraacetat

NH ₄ Cl	Ammoniumchlorid
NO	Stickoxid
n. s.	nicht signifikant
PAS	Periodic-acid-Schiff
PDGF	Platelet derived growth factor
PBS	Phosphate buffered saline
RANTES	Regulated upon activation normal T cell expressed and secreted
RNA	Ribonukleinsäure
RT-PCR	Real-time-polymerase-chain-reaction
SDS	Sodium dodecyl sulfate
TARC	Thymus and activation regulated chemokine
TCA	Thymus-derived chemotactic agent
TGF- β	Transforming growth factor- β
TIMP	Tissue inhibitors of metalloproteinases
TNF- α	Tumor necrosis factor- α
vMIP	Viral macrophage inflammatory protein
vs.	versus

8. Referenzen

- Abbate M, Zoja C, Corna D, Capitanio M, Bertani T, Remuzzi G: In progressive nephropathies, overload of tubular cells with filtered proteins translates glomerular permeability dysfunction into cellular signals of interstitial inflammation. *J Am Soc Nephrol* 9:1213-1224, 1998
- Agace WW, Roberts AI, Wu L, Greineder C, Ebert EC, Parker CM: Human intestinal lamina propria and intraepithelial lymphocytes express receptors specific for chemokines induced by inflammation. *Eur J Immunol* 30:819-826, 2000
- Anders HJ, Vielhauer V, Kretzler M, Cohen CD, Segerer S, Luckow B, Weller L, Gröne HJ, Schlöndorff D: Chemokine and chemokine receptor expression during initiation and resolution of immune complex glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* 12:919-931, 2001
- Anders HJ, Vielhauer V, Frink M, Linde Y, Cohen CD, Blattner SM, Kretzler M, Strutz F, Mack M, Gröne HJ, Onuffer J, Horuk R, Nelson PJ, Schlöndorff D: A chemokine receptor CCR-1 antagonist reduces renal fibrosis after unilateral ureter ligation. *J Clin Invest* 109:251-259, 2002
- Anders HJ, Banas B, Linde Y, Weller L, Cohen CD, Kretzler M, Martin S, Vielhauer V, Schlöndorff D, Gröne HJ: Bacterial CpG-DNA aggravates immune complex glomerulonephritis: role of TLR9-mediated expression of chemokines and chemokine receptors. *J Am Soc Nephrol* 14:317-26, 2003
- Bohle A, Müller GA, Wehrmann M, Hackensen-Haen S, Xiao JC: Pathogenesis of chronic renal failure in the primary glomerulopathies, renal vasculopathies and chronic interstitial nephritides. *Kidney Int Suppl* 49:S2-S9, 1996
- Border WA, Okuda S, Languino LR, Sporn MB, Ruoslahti E: Suppression of experimental Glomerulonephritis by antiserum against transforming growth factor β_1 . *Nature* 346:371-374, 1991
- Broolmans RA, Stegmann APA, Van Dorp WT, Van der Ark AAJ, Van der Woude FJ, Van Es LA, Daha MR: Interleukin 2 mediates stimulation of complement C3 biosynthesis in human proximal tubular epithelial cells. *J Clin Invest* 88:379-384, 1991
- Bucala R, Spiegel LA, Chesney J, Hogan M, Cerami A.: Circulating fibrocytes define a new leukocyte subpopulation that mediates tissue repair. *Mol Med* 1:71-81, 1994
- Cameron JS, Glassock RJ: Natural history and outcome of the nephritic syndrome. In: Cameron JS, Glassock RJ, eds. *The nephrotic syndrome*. New York: Marcel Dekker, 999-1033, 1988
- Chen JK, Hishi H, McKeehan WL: Transforming growth factor type β specifically stimulates synthesis of proteoglycan in human adult arterial smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:5287-5291, 1987
- Chen S, Bacon KB, Li L, Garcia GE, Xia Y, Lo D, Thompson DA, Siani MA, Yamamoto T, Harrison JK, Feng L: In vivo inhibition of CC and CX3C Chemokine-induced leukocyte infiltration and attenuation of Glomerulonephritis in Wistar-Kyoto (WKY) rats by vMIP-II. *J Exp Med* 188:193-198, 1998
- Chomczynski P, Sacchi N: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162:156-159, 1987

- Cohen CD, Frach K, Schlöndorff D, Kretzler M: Quantitative gene expression analysis in renal biopsies: A novel protocol for a high-throughput multicenter application. *Kidney Int* 61:133-140, 2002
- D'Amico G: Influence of clinical and histological features on actuarial renal survival in adult patients with idiopathic IgA nephropathy, membranous nephropathy and membranoproliferative Glomerulonephritis: survey of the recent literature. *Am J Kidney Dis* 20:315-323, 1992
- Diamond JR, Anderson S: Irreversible tubulointerstitial damage associated with chronic aminonucleoside nephrosis. *Am J Pathol* 137:1323-1332, 1990
- Diamond JR, Ricardo SD, Klahr S: Mechanisms of interstitial fibrosis in obstructive nephropathy. *Sem Nephrol* 18:594-602, 1998
- Douglas MS, Ali S, Rix DA, Zhang J-G, Kirby JA: Endothelial production of MCP-1: modulation by heparin and consequences for mononuclear cell activation. *Immunology* 92:512-518, 1997
- Eddy AA: Interstitial nephritis induced by protein-overload proteinuria. *Am J Pathol* 135:719-733, 1989
- Edwards DR, Murphy G, Reynolds JJ, Whitman SE, Docherty AJP, Angel P, Heath JK: Transforming growth factor β modulates the expression of collagenase and metalloproteinase inhibitor. *EMBO J* 6:1899-1904, 1987
- Eltayeb S, Sunnemark D, Berg AL, Nordvall G, Malmberg A, Lassmann H, Wallstrom E, Olsson T, Ericsson-Dahlstrand A: Effector stage CC chemokine receptor-1 selective antagonism reduces multiple sclerosis-like rat disease. *J Neuroimmunol* 142:75-85, 2003
- Fogo AB, Kon V: Pathophysiology of progressive renal diseases – an overview, in *Immunologic renal diseases*, 2nd ed., edited by Neilson EG, Couser WG, Philadelphia, Lippincott Williams&Wilkins, 2001
- Frei U, Schober-Halstenberg HJ: Nierenersatztherapie in Deutschland – Bericht über Dialysebehandlung und Nierentransplantation in Deutschland 2001/2002. *QuaSi Niere* 2002.
- Garcia GE, Xia Y, Harrison J, Wilson CB, Johnson RJ, Bacon KB, Feng L: Mononuclear cell-infiltrate inhibition by blocking macrophage-derived chemokine results in attenuation of developing crescentic glomerulonephritis. *Am J Pathol* 162:1061-1073, 2003
- Gewirtz AM, Zhang J, Ratajczak J, Ratajczak M, Park KS, Li CQ, Yan ZQ, Poncz M: Chemokine regulation of human megakaryocytopoiesis. *Blood* 86:2559-2567, 1995
- Gharaee-Kermani M, Denholm EM, Phan SH: Costimulation of fibroblast collagen and transforming growth factor beta 1 gene expression by monocyte chemoattractant protein-1 via specific receptors. *J Biol Chem* 271:17779-17784, 1996
- Gong JH, Clark-Lewis I: Antagonists of monocyte chemoattractant protein 1 identified by modification of functionally critical NH2-terminal residues. *J Exp Med* 181:631-640, 1995
- Grond J, Schilithuis MS, Koudstaal J, Elema JD: Mesangial function and glomerular sclerosis in rats after unilateral nephrectomy. *Kidney Int* 22:338-343, 1982
- Grond J, Weening JJ, Elema JD: Glomerular sclerosis in nephritic rats: Comparison of the long-term effects of adriamycin and aminonucleoside. *Lab Invest* 51:277-285, 1984
- Gröne HJ, Weber C, Weber KS, Gröne EF, Rabelink T, Klier CM, Wells TN, Proudfoot AE, Schlöndorff D, Nelson PJ: Met-RANTES reduces vascular and tubular damage during acute renal transplant rejection: blocking monocyte arrest and recruitment. *FASEB J* 13:1371-1383, 1999

- Hasegawa H, Kohno M, Sasaki M, Inoue A, Ito MR, Terada M, Hieshima K, Maruyama H, Miyazaki J, Yoshie O, Nose M, Fujita S: Antagonist of monocyte chemoattractant protein 1 ameliorates the initiation and progression of lupus nephritis and renal vasculitis in MRL/lpr mice. *Arthritis Rheum* 48:2555-2566, 2003
- Haverty TP, Kelly CJ, Hines WH, Amenta PS, Watanabe M, Harper RA, Kefalides NA, Neilson EG: Characterization of a renal tubular epithelial cell line which secretes the autologous target antigen of autoimmune experimental interstitial nephritis. *J Cell Biol* 107:1359-1368, 1988
- Hesseltgesser J, Ng HP, Liang M, Zheng W, May K, Baumann JG, Monahan S, Islam I, Wei GP, Ghannam A, Taub DD, Rosser M, Snider RM, Morrissey MM, Perez HD, Horuk R: Identification and characterization of a small molecule functional antagonist of the CCR1 chemokine receptor. *J Biol Chem* 273:15687-15692, 1998
- Horuk R, Clayberger C, Krensky AM, Wang Z, Gröne HJ, Weber C, Weber KS, Nelson PJ, May K, Rosser M: A non-peptide functional antagonist of the CCR1 chemokine receptor is effective in rat heart transplant rejection. *J Biol Chem* 276:4199-4204, 2001
- Horuk R, Shurey S, NG HP, May K, Bauman JG, Islam I, Ghannam A, Buckman B, Wei GP, Xu W, Liang M, Rosser M, Dunning L, Hesseltgesser J, Snider RM, Morrissey MM, Perez HD, Green C: CCR1-specific non-peptide antagonist: efficacy in a rabbit allograft rejection model. *Immunol Lett* 76:193-201, 2001
- Johnatty RN, Taub DD, Reeder SP, Turcovski-Corrales SM, Cottam DW, Stephenson TJ, Rees RC: Cytokine and chemokine regulation of proMMP-1 and TIMP-1 production by human peripheral blood lymphocytes. *J Immunol* 158:2327-2333, 1997
- Johnson RJ, Raines EW, Floege J, Yoshimura A, Pritzl P, Alpers C, Ross R: Inhibition of mesangial cell proliferation and matrix expansion in glomerulonephritis in the rat by antibody to platelet-derived growth factor. *J Exp Med* 175:1413-1416, 1992
- Kang DH, Kanellis J, Hugo C, Truong L, Anderson S, Kerjaschi D, Schreiner GF, Johnson RJ: Role of the microvascular endothelium in progressive renal disease. *J Am Soc Nephrol* 13:806-816, 2002
- Kledal TN, Roskilde MM, Coulin F, Simmons G, Johnsen AH: A broad-spectrum chemokine antagonist encoded by Kaposi's-sarkoma-associated herpesvirus. *Science* 227:1656-1659, 1997
- Koch AE, Polverini PJ, Kunkel SL, Harlow LA, Dipietro LA, Elner VM, Elner SG, Strieter RM: Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis. *Science* 258:1798-1801, 1992
- Kondo S, Kagami S, Kido H, Strutz F, Muller GA, Kuroda Y: Role of mast cell tryptase in renal interstitial fibrosis. *J Am Soc Nephrol* 12:1668-1676, 2001
- Kriz W, Kretzler M, Nagata M, Provoost AP, Shirato I, Uiker S, Sakai T, Lemley KV: A frequent pathway to glomerulosclerosis: deterioration of tuft architecture-podocyte damage-segmental sclerosis. *Kidney Blood Press Res* 19:245-253, 1996
- Kuhlmann U, Walb D: *Nephrologie: Pathophysiologie – Klinik – Praxis*. Thieme, Stuttgart; New York, 1994
- Kunkel EJ, Campbell JJ, Haraldsen G, Pan J, Boisvert J, Roberts AI, Ebert EC, Vierra MA, Goodman SC, Genovese MC, Wardlaw AJ, Greenberg HB, Parker CM, Butcher EC, Andrew DP, Agace WW: Lymphocyte CCR9 and epithelial TECK expression distinguish the small intestine immune compartment: epithelial expression of tissue-specific chemokines as an organizing principle in regional immunity. *J Exp Med* 192:761-768, 2000

- Kunkel EJ, Boisvert J, Murphy K, Vierra MA, Genovese MC, Wardlaw AJ, Greenberg HB, Hodge MR, Wu L, Butcher EC, Campbell JJ: Expression of the chemokine receptors CCR4, CCR5 and CXCR3 by human tissue-infiltrating lymphocytes. *Am J Pathol* 160:347-355, 2002
- Lalich JJ, Burkholder PM, Paik WC: Protein overload nephropathy in rats with unilateral nephrectomy: A correlative light immunofluorescence and electron microscopical analysis. *Arch Pathol* 99:72-79, 1975
- Liang M, Mallari C, Rosser M, Ng HP, May K, Monahan S, Bauman JG, Islam I, Ghannam A, Buckman B, Shaw K, Wei GP, Xu W, Zhao Z, Ho E, Shen J, Oanh H, Subramanyam B, Vergona R, Taub D, Dunning L, Harvey S, Snider RM, Hesselgesser J, Morrissey MM, Perez HD: Identification and characterization of a potent, selective, and orally active antagonist of the CC Chemokine receptor 1. *J Biol Chem* 275:19000-19008, 2000
- Ljungquist A: The intrarenal arterial pattern in the normal and diseased human kidney. *Acta Med Scand.* 174 Suppl 401:5-34, 1963
- Lloyd CM, Minto AW, Dorf ME, Proudfoot A, Wells TNC, Salant DJ, Gutierrez-Ramos, JC: RANTES and monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) play an important role in the inflammatory phase of crescentic nephritis, but only MCP-1 is involved in crescent formation and interstitial fibrosis. *J Exp Med* 185:1371-1380, 1997
- Mack M, Luckow B, Nelson PJ, Cihak J, Simmons G, Clapham PR, Signoret N, Marsh M, Stangassinger M, Borlat F, Wells TN, Schlöndorff D, Proudfoot AE: Aminooxypentane-RANTES induces CCR5 internalization but inhibits recycling: A novel inhibitory mechanism of HIV infectivity. *J Exp Med.* 187:1215-1224, 1998
- Mallick NP, Short CD, Hunt LP: How far since Ellis? The Manchester study of glomerular disease. *Nephron* 46:113-124, 1987
- Murphy PM: The molecular biology of leukocyte chemoattractant receptors. *Annu Rev Immunol* 12:593-633, 1994
- Navar LG, Gauthier-Lewis L, Hymel A, Broam B, Mitchell KD: Assessment of intraluminal, kidney and plasma levels of angiotensin I and II in anesthetized rats. *J Am Soc Nephrol* 3:442, 1992
- Nebel M: Behandlungskosten der Nierenersatztherapie in Deutschland 1999. *Nieren- und Hochdruckkrankheiten* 31:85-92, 2002
- Nelson PJ, Krensky AM: Chemokines, chemokine receptors and allograft rejection. *Immunity* 14:377-386, 2001
- Norman JT, Orphanides C, Garcia P, Fine LG: Hypoxia-induced changes in extracellular matrix metabolism in renal cells. *Exp Nephrol* 7:463-469, 1999
- Ohtake T, Kimura M, Nishimura M, Hishida A: Roles of reactive oxygen species and antioxidant enzymes in murine daunomycin-induced nephropathy. *J Lab Clin Med* 129:81-88, 1997
- Olson JL, Hostetter Th, Rennke HG, Brenner BM, Venkatachalam MA: Altered glomerular permselectivity and progressive sclerosis following extreme ablation of renal mass. *Kidney Int* 22:112-126, 1982
- Panzer U, Schneider A, Wilken J, Thompson DA, Kent SB, Stahl RA: The chemokine receptor antagonist AOP-RANTES reduces monocyte infiltration in experimental glomerulonephritis. *Kidney Int* 56:2107-2115, 1999

- Pawluczyk IZ, Harris KP: Macrophages promote prosclerotic responses in cultured rat mesangial cells: a mechanism for the initiation of glomerulosclerosis. *J Am Soc Nephrol* 8:1525-1536, 1997
- Perez de Lema G, Maier H, Nieto E, Vielhauer V, Luckow B, Mampaso F, Schlöndorff D: Chemokine expression precedes inflammatory cell infiltration and Chemokine receptor and cytokine expression during the initiation of murine lupus nephritis. *J Am Soc Nephrol* 12:1369-1382, 2001
- Premack BA, Schall TJ: Chemokine receptors: gateways to inflammation and infection. *Nat Med* 2:1174-1178, 1997
- Prodjosudjadi W, Gerritsma JSJ, Klar-Mohamad N, Gerritsen AF, Bruijn JA, Daha MR, van Es LA: Production and cytokine mediated regulation of monocyte chemoattractant protein-1 by human proximal tubular epithelial cells. *Kidney Int* 48:1477-1486, 1995
- Proudfoot AE, Power CA, Hoogewerf AJ, Montjovent MO, Borlat F, Offord RE, Wells TNC: Extension of recombinant human RANTES by the retention of the initiating methionine produces a potent antagonist. *J Biol Chem* 271:2599-2603, 1996
- Qin S, Rottmann JB, Myers P, Kassam N, Weinblatt M, Loetscher M, Koch AE, Moser B, Mackay CR: The chemokine receptors CXCR3 and CCR5 mark subsets of T cells associated with certain inflammatory reactions. *J Clin Invest* 101:746-754, 1998
- Ramdin L, Perks B, Sheron N, Shute JK: Regulation of interleukin-8 binding and function by heparin and α 2-makroglobulin. *Clin Exp All* 28:616-624, 1998
- Remuzzi G, Bertani T: Is glomerulosclerosis a consequence of altered glomerular permeability to macromolecules? *Kidney Int* 38:384-394, 1990
- Risdon RA, Sloper JC, de Vardener HE: Relationship between renal function and histologic changes found in renal-biopsy specimens from patients with persistent glomerulonephritis. *Lancet* 2:363-366, 1968
- Roberts AB, Sporn MB, Assolan RK, Smith JM, Roche NS, Wakefield LM, Heine UI, Liotta LA, Falanga V, Kehrl JH, Fauch AS: Transforming growth factor type β : Rapid induction of fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulation of collagen formation in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:4167-4171, 1986
- Rovin BH, Yoshimura T, Tan L: Cytokine induced production of monocyte chemoattractant protein-1 by cultured human mesangial cells. *J Immunol* 148:2148-2153, 1992
- Saito T, Atkins RC: Contribution of mononuclear leukocytes in the progression of experimental focal glomerular sclerosis. *Kidney Int* 37:1076-1083, 1990
- Satriano JA, Hora K, Shan Z, Stanley ER, Mori T, Schlöndorff D: Regulation of monocyte chemoattractant protein-1 and macrophage colony-stimulating factor-1 by IFN- γ , tumor necrosis factor- α , IgG aggregates, and cAMP in mouse mesangial cells. *J Immunol* 150:1971-1978, 1993
- Savage K, Siebert E, Swann D: The effect of platelet-derived growth factor on cell division and glycosaminoglycan synthesis by skin and scar fibroblasts. *J Clin Invest* 84:1036-1040, 1989
- Schlöndorff D, Nelson PJ, Luckow B, Banas B: Chemokines and renal disease. *Kidney Int* 51:610-621, 1997
- Segal R, Fine LG: Polypeptide growth factors and the kidney. *Kidney Int* 36:2-10, 1989

- Segerer S, Mack M, Regele H, Kerjaschki D, Schlöndorff D: Expression of the CC-chemokine receptor 5 in human kidney diseases. *Kidney Int* 56:52-64, 1999
- Segerer S, Nelson PJ, Schlöndorff D: Chemokines, chemokine receptors, and renal disease: From basic science to pathophysiologic and therapeutic studies. *J Am Soc Nephrol* 11:152-176, 2000
- Shields PL, Morland CM, Salmon M, Qin S, Hubscher SG, Adams DH: Chemokine and chemokine receptor interactions provide mechanism for selective T cell recruitment to specific liver compartments within hepatitis C-infected liver. *J Immunol* 163:6236-6243, 1999
- Shimizu H, Maruyama S, Yuzawa Y, Kato T, Miki Y, Suzuki S, Sato W, Morita Y, Maruyama H, Egashira K, Matsuo S: Anti-monocyte chemoattractant protein-1 gene therapy attenuates renal injury induced by protein-overload proteinuria. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 14,1496-505, 2003
- Simmons G, Clapham PR, Picard L, Offord RE, Rosenkilde MM, Schwartz TW, Buser R, Wells TN, Proudfoot AE: Potent inhibition of HIV-1 infectivity in macrophages and lymphocytes by a novel CCR5 antagonist. *Science* 276:276-279, 1997
- Sorensen TL, Tani M, Jensen J, Pierce V, Lucchinetti C, Folcik VA, Qin S, Rottmann J, Sellebjerg F, Strieter RM, Fredriksen JL, Ransohoff RM: Expression of specific chemokines and chemokine receptors in the central nervous system of multiple sclerosis patients. *J Clin Invest* 103:807-815, 1999
- Springer TA: Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* 76:301-314, 1994
- Springer TA: Traffic signals on endothelium for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration. *Annu Rev Physiol* 57:827-872, 1995
- Strutz F, Okada H, Lo CW, Danoff T, Carone RL, Tomaszewski JE, Neilson EG: Identification and characterization of a fibroblast marker: FSP-1. *J Cell Biol* 130:393-405, 1995
- Strutz F: Potential methods to prevent interstitial fibrosis in renal disease. *Expert opin investing drugs* 10:1989-2001, 2001
- Strutz F, Zeisberg M, Ziyadeh FN, Yang CQ, Kalluri R, Muller GA, Neilson EG: Role of fibroblastic growth factor-2 in epithelial-mesenchymal transformation. *Kidney Int* 61:1714-1728, 2002
- Tavoloni N, Guarino AM: Disposition and metabolism of adriamycin in the rat. *Pharmacology* 21:244-255, 1980
- Tesch GH, Maifert S, Schwarting A, Rollins BJ, Kelley VR: Monocyte chemoattractant protein-1-dependent leukocytic infiltrates are responsible for autoimmune disease in MRL-Fas(lpr) mice. *J Exp Med* 190:1813-1824, 1999
- Tokuda A, Itakura M, Onai N, Kimura H, Kuriyama T, Matsushima K: Pivotal role of CCR1-positive leukocytes in bleomycin-induced lung fibrosis in mice. *J Immunol* 164:2745-2751, 2000
- Tsuboi N, Yoshikai Y, Matsuo S, Kikuchi T, Iwami K, Nagai Y, Takeuchi O, Akira S, Matsuguchi T: Roles of toll-like receptors in C-C chemokine production by renal tubular epithelial cells. *J Immunol* 169:2026-33, 2002
- Umekawa T, Chegini N, Khan SR: Increased expression of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) by renal epithelial cells in culture on exposure to calcium oxalate, phosphate and uric acid crystals. *Nephrol Dial Transplant* 18:664-9, 2003

- Vielhauer V, Anders HJ, Mack M, Cihak J, Strutz F, Stangassinger M, Luckow B, Gröne HJ, Schlöndorff D: Obstructive nephropathy in the mouse: progressive fibrosis correlates with tubulointerstitial chemokine expression and accumulation of CC chemokine receptor 2- and 5-positive leukocytes. *J Am Soc Nephrol* 12:1173-1187, 2001
- Vielhauer V, Eis V, Schlöndorff D, Anders HJ: Identifying chemokines as therapeutic targets in renal disease: lessons from antagonist studies and knockout mice. *Kidney Blood Press Res* 27:226-38, 2004
- Wada T, Tomosugi N, Naito T, Yokoyama H, Kobayashi K, Harada A, Mukaida N, Matsu-shima K: Prevention of proteinuria by the administration of anti-interleukin 8 antibody in experimental acute immune complex-induced Glomerulonephritis. *J Exp Med* 180:1135-1140, 1994
- Wang Y, Chen J, Chen L, Tay YC, Rangan GK, Harris DC: Induction of monocyte chemoattractant protein-1 in proximal tubule cells by urinary protein. *J Am Soc Nephrol* 8:1537-1545, 1997
- Wang Y, Rangan GK, Tay YC, Wang Y, Harris DC: Induction of monocyte chemoattractant protein-1 by albumin is mediated by nuclear factor kappaB in proximal tubule cells. *J Am Soc Nephrol* 10:1204-1213, 1999
- Wang Y, Wang YP, Tay YC, Harris DC: Progressive adriamycin nephropathy in mice: sequence of histologic and immunohistochemical events. *Kidney Int.* 58:1797-804., 2000
- Weber C, Weber KS, Klier C, Gu S, Wank R, Horuk R, Nelson PJ: Specialized roles of the chemokine receptors CCR1 and CCR5 in the recruitment of monocytes and TH1-like/CD45RO(+) T Cells. *Blood* 97:1144-1146, 2001
- Wehrmann M, Bohle A, Helol H, Schumm G, Kendziorra H, Pressler H: Long-term prognosis of focal sclerosing glomerulonephrosis. An analysis of 250 cases with particular regard to tubulo-interstitial changes. *Clin Nephrol* 33:115-122, 1990
- Wiedermann CJ, Kowald E, Reinisch N, Kaehler CM, Von Luetlichau I, Pattison JM, Huie P, Sibley RK, Nelson PJ, Krensky AM: Monocyte Haptotaxis induced by the RANTES chemokine. *Curr Biol* 3:735-739, 1993
- Wolf G, Aberle S, Thaiss F, Nelson PJ, Krensky AM, Neilson EG, Stahl RAK: TNF alpha induces expression of the chemoattractant cytokine RANTES in cultured mouse mesangial cells. *Kidney Int* 44:795-804, 1993
- Wolf G, Luckow B, Schlöndorff D: Molecular biology and function of the chemoattractant cytokines RANTES and CSF-1, in *Molecular Nephrology-Kidney function in health and disease*, edited by Schlöndorff D, Bonverte JV, New York, Marcel Dekker, 673-679, 1995
- Wolf G, Ziyadeh FN, Thaiss F, Tomaszewski J, Caron RJ, Wenzel U, Zahner G, Helmchen U, Stahl RA: Angiotensin II stimulates expression of the chemokine RANTES in rat glomerular endothelial cells: Role of the angiotensin type II receptor. *J Clin Invest* 100:1047-1058, 1997
- Wuthrich RP, Glimcher LH, Yui MA, Jevinkar AM, Dumas SE, Kelley VE: MHC Class II antigen presentation and tumor necrosis factor in renal tubular epithelial cells. *Kidney Int* 37:783-792, 1990
- Xia M, Leppert D, Hauser SL, Sreedharan SP, Nelson PJ, Krensky AM, Goetzel EJ: Stimulus specificity of matrix metalloproteinase dependence of human T cell migration through a model basement membrane. *J Immunol* 156:160-167, 1996

- Yamamoto T, Nishioka K: Role of monocyte chemoattractant protein-1 and its receptor, CCR-2, in the pathogenesis of bleomycin-induced scleroderma. *J Invest Dermatol* 121:510-516, 2003
- Yang X-D, Corvalan JRF, Wang P, Roy C, Davis CG: Fully human anti-interleukin-8 monoclonal antibodies: potential therapeutics for treatment of inflammatory disease states. *J Leuko Biol* 66:401-410, 1999
- Yoshie O, Imai T, Nomiyama H: Novel lymphocyte-specific CC chemokines and their receptors. *J Leukocyte Biol* 62:634-644, 1997
- Yu L, Border WA, Huang Y, Noble NA: TGF- β isoforms in renal fibrogenesis. *Kidney Int* 64:844, 2003
- Zeisberg M, Strutz F, Müller GA: Role of fibroblast activation in inducing interstitial fibrosis. *J Nephrol* 3:111-120, 2000
- Zoja C, Morigi M, Figliuzzi M, Bruzzi I, Oldroyd S, Benigni A, Ronco P, Remuzzi G: Proximal tubular cell synthesis and secretion of endothelin-1 on challenge with albumin and other proteins. *Am J Kidney Dis* 26:934-941, 1995
- Zoja C, Liu XH, Donadelli R, Abbate M, Testa D, Corna D, Tarabolletti G, Vecchi A, Dong QG, Rollins BJ, Bertani T, Remuzzi G: Renal expression of monocyte chemoattractant protein-1 in lupus autoimmune mice. *J Am Soc Nephrol* 8:720-729, 1997
- Zoja C, Donadelli R, Colleoni S, Figliuzzi M, Bonazzola S, Morigi M, Remuzzi G: Protein overload stimulates RANTES production by proximal tubular cells depending on NF- κ B activation. *Kidney Int* 53:1608-1615, 1998

9. Anhang

9.1 Curriculum Vitae

geboren: 19.06.1978 in Würzburg
 Staatsangehörigkeit: deutsch
 Familienstand: ledig

Schulische Ausbildung:

1984–1988 Grundschole, München
 1988–1997 Käthe-Kollwitz-Gymnasium, München
 27.06.1997 Erlangung der Allgemeinen Hochschulreife (Note: 1,8)

Wehrersatzdienst:

08/1997–08/1998 Pflegedienst, Krankenhaus der Barmherzigen Brüder, München

Studium:

ab November 1998 Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität in München
 06.09.2000 Ärztliche Vorprüfung (Noten: schriftl.: 3; mündl.: 2; gesamt: 2,66)
 28.08.2001 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note: 3,0)
 19.09.2003 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Noten: schriftl.: 2; mündl.: 1; gesamt: 1,66)
 10/2003–09/2004 Praktisches Jahr
 07.12.2004 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note: 1,0)

Sonstige medizinische Tätigkeit:

1996–2003 Mitgliedschaft in der Bereitschaft West 1 des Bayerischen Roten Kreuzes
 1999 Teilnahme am Fachlehrgang Rettungsdienst des Bayerischen Roten Kreuzes
 1999–2004 Nebentätigkeit für den Urban & Fischer-Verlag in den Lektoraten Nachschlagewerke, Medizinstudenten, Medizin online

Wissenschaftliche Tätigkeit:

seit August 2000 wissenschaftliche Arbeit zur Erlangung der Promotion in der Medizinischen Poliklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München, Leitung Prof. Dr. Schlöndorff

Veröffentlichungen:

Vielhauer V, **Berning E**, Eis V, Kretzler M, Segerer S, Strutz F, Horuk R, Gröne HJ, Schlöndorff D, Anders HJ: CCR1 blockade reduces interstitial inflammation and fibrosis in mice with glomerulosclerosis and nephrotic syndrome. *Kidney Int* 66:2264-78, 2004

Präsentationen:

Vielhauer V, **Berning E**, Linde Y, Kretzler M, Strutz F, Horuk R, Gröne HJ, Schlöndorff D, Anders HJ: CC chemokine receptor 1 blockade reduces interstitial inflammation and fibrosis, but not glomerular lesions in murine focal segmental glomerulosclerosis. *Nephrol Dial Transplant* 18:304, 2003 (Poster auf dem 34. Kongreß der Gesellschaft für Nephrologie / 2. ISN World Congress of Nephrology, Berlin 08.06.-12.06. 2003)

Vielhauer V, **Berning E**, Linde Y, Kretzler M, Strutz F, Horuk R, Gröne HJ, Schlöndorff D, Anders HD: A CCR1 antagonist reduces interstitial nephritis and fibrosis, but not proteinuria and glomerular pathology in murine adriamycin nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 14: 383, 2003 (Poster auf der 35. Jahrestagung der American Society of Nephrology, San Diego 12.11.-17.11.2003)

9.2 Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Humanmedizin der Ludwig-Maximilians-Universität München zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel:

Die Blockade des Chemokinrezeptors CCR1 reduziert bei Mäusen mit Adriamycin-induzierter Glomerulosklerose die interstitielle Entzündung und Fibrose

an der Medizinischen Poliklinik unter der Leitung von Professor Dr. D. Schlöndorff selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Zitierungen anderer wissenschaftlicher Arbeiten sind unter Angabe der Quelle als solche kenntlich gemacht.

Ich habe bisher weder an einer in- und ausländischen Medizinischen Fakultät bzw. Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Die vorliegende Arbeit wurde teilweise in folgendem Publikationsorgan veröffentlicht:

Vielhauer V, **Berning E**, Eis V, Kretzler M, Segerer S, Strutz F, Horuk R, Gröne HJ, Schlöndorff D, Anders HJ: CCR1 blockade reduces interstitial inflammation and fibrosis in mice with glomerulosclerosis and nephrotic syndrome. Kidney Int 66:2264-78, 2004

München, 01.11.2005

9.3 Danksagung

Mein Dank gilt:

Meinen Eltern, ohne deren Unterstützung ich zu dieser Arbeit nicht in der Lage gewesen wäre.

Meinen Freunden, die stets an mich geglaubt, mir auch in schwierigen Phasen zur Seite gestanden und mir Mut gemacht haben.

Herrn Prof. Dr. med. Detlef Schlöndorff für die Möglichkeit, die vorliegende Dissertation in seinem Labor durchführen zu können. Ihm danke ich auch für die erfahrene Förderung, sein fortwährendes Interesse an meiner Arbeit und seine ständige Gesprächsbereitschaft.

Herrn Dr. med. Volker Vielhauer und Herrn PD Dr. med. Hans-Joachim Anders für die vielen fruchtbaren und motivierenden Diskussionen und die exzellente Betreuung der vorliegenden Arbeit.

Frau Yvonne Linde und Herrn Dr. Michael Frink für ihre fachliche Kompetenz, ihre Hilfe und ihre Freundschaft.

Herrn Prof. Dr. med. Hermann-Josef Gröne für die Paraffineinbettungen und die Elektronenmikroskopien.

Herrn Vaclav Eis für die Unterstützung bei den Zellkulturversuchen.

Den nicht namentlich aufgeführten Mitarbeitern an der Medizinischen Poliklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München für ihre stete Hilfsbereitschaft.